



EVALUACIÓN DE CEPAS DE MICROALGAS PARA CAPTURA DE CO₂

Alejandra Giraldo Rave

**Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Medellín, 2013**



EVALUACIÓN DE CEPAS DE MICROALGAS PARA CAPTURA DE CO₂

Alejandra Giraldo Rave

Tesis de investigación presentada para optar al título de:

Magister en Ingeniería

Asesor:

Alex Armando Sáez Vega

**Universidad EAFIT
Escuela de Ingeniería
Medellín, 2013**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Medellín, Noviembre 7 de 2013

CONTENIDO

1.?	INTRODUCCIÓN	?
1.1.?	Cambio Climático y Gases de efecto invernadero (GEI)	?
1.2.?	Evolución de las emisiones	?
1.3.?	Sistemas de captura y reducción del CO ₂	?
1.3.1.?	Captura de CO ₂ mediante sistemas biológicos	?
?		
?		
2.?	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	?
?		
3.?	JUSTIFICACIÓN	?
?		
4.?	OBJETIVOS	?
4.1.?	Objetivo General	?
4.2.?	Objetivos Específicos	?
?		
5.?	MARCO TEÓRICO	?
5.1.?	Microalgas	?
5.1.1.?	Composición	?
5.1.2.?	Aplicaciones de las microalgas	?
5.2.?	Fijación del CO ₂	?
5.2.1.?	Fotosíntesis y fijación del CO ₂	?
5.3.?	Cultivo de microalgas	?
5.3.1.?	Macronutrientes	?
5.3.2.?	Micronutrientes	?

- 5.3.3.2 Elementos traza
- 5.3.4.2 Vitaminas, proteínas y otros cofactores en el crecimiento
- 5.3.5.2 Factores externos involucrados en el crecimiento
- 5.4.2 Métodos de cultivo
- 5.4.1.2 Tipos de reactores

2

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

- 6.1.2 Mantenimiento de microalgas
- 6.2.2 Condiciones de cultivo en ensayos de crecimiento
 - 6.2.1.2 Ensayos de crecimiento con aire
 - 6.2.2.2 Ensayos de crecimiento con Aire + CO₂
 - 6.2.3.2 Estudio del efecto de la variación de la concentración de los nutrientes NaNO₃ (Nitrato) y H₂HPO₄ (Fosfato) sobre el medio de cultivo de 4 cepas de microalgas candidatas para captura de CO₂
- 6.3.2 Cuantificación de Biomasa
- 6.4.2 Parámetros cinéticos de crecimiento de las microalgas
- 6.5.2 Análisis estadístico
- 6.6.2 Diseño experimental

2

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 7.1.2 Ensayos de crecimiento con Aire
- 7.2.2 Ensayos de crecimiento con Aire + CO₂
- 7.3.2 Comparación entre ensayos Aire y Aire + CO₂
 - 7.3.1.2 Selección de microalgas para estudio de medios de cultivo
- 7.4.2 Estudio de medios de cultivo
 - 7.4.1.2 Análisis de superficie de respuesta para los resultados experimentales
 - 7.4.2.2 Resultados para cada cepa de estudio

El sistema alcanza un punto óptimo global (Gráfica 13), donde

- 7.5.2 Ensayo de Validaciones para la optimización de la concentración celular y la productividad del sistema

2

8. CONCLUSIONES

9. RECOMENDACIONES

10. ANEXOS

10.1. Anexo I. Composición de los medios de cultivo utilizados para el mantenimiento de las microalgas y en los ensayos de crecimiento con Aire y Aire + CO₂

10.2. Anexo II. Ensayos de crecimiento con Aire.

10.3. Anexo III. Ensayos de crecimiento con Aire + CO₂.

10.4. Anexo IV. Ensayo de medios de cultivo con las cepas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505

10.5. ANEXO V. Ensayos de validación para la optimización de la Concentración Celular y la Productividad para las microalgas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505

11. BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores y sus niveles de diseño experimental para la evaluación en la producción de biomasa y productividad	38
Tabla 2. Distribución tratamientos en el diseño experimental	38
Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento del conjunto de cepas estudiadas .	42
Tabla 4. Prueba de múltiples rangos para concentración celular (a) y productividad por cepa (b). Método: 95.0 porcentaje Tukey	44
Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento del conjunto de cepas estudiadas .	47
Tabla 6. Diferencias significativas entre ensayos de crecimiento con Aire y Aire + CO ₂	49
Tabla 7. Cepas con mayor valor de Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)	51
Tabla 8. Parámetros de selección y valores promedio asignados.	51
Tabla 9. Calificación total asignada a cada cepa de estudio	52
Tabla 10. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Concentración celular (g/L)	55
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para Productividad (g/L.d)	59
Tabla 12. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)	62
Tabla 13. Análisis de Varianza (ANOVA) para la concentración celular	65
Tabla 14. Análisis de varianza (Anova) para Productividad (g/L.d).....	67
Tabla 15. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)	69
Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) para la concentración celular	72

Tabla 17. Análisis de varianza (Anova) para Productividad (g/L.d).....	74
Tabla 18. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)	77
Tabla 19. Análisis de Varianza (ANOVA) para la concentración celular	79
Tabla 20. Puntos óptimos para concentración celular	82
Tabla 21. Análisis de varianza para productividad (g/L.d)	83
Tabla 22. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)	85

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Promedio mundial de la fracción molar de los gases de efecto invernadero de larga duración CO₂, CH₄ y N₂O respectivamente (a) y el índice de crecimiento para cada uno (b) desde 1984 hasta 2011. El índice de crecimiento medio se muestra mediante columnas en (b) (OMM, 2012)6²
- Gráfica 2.** Consumo mundial de energía primaria anual (Cuatrillones de Btu/año, 1 cuatrillón=1015 Btu) por las diferentes fuentes, desde 1970 a 2001 y su predicción hasta 2025. (International Energy Outlook 2003).....7²
- Gráfica 3.** Perfiles de crecimiento de las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, UTEX 1230, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505. Medio BBM, Temperatura 25 ± 2 °C; iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm con fotoperiodo luz: oscuridad (12:12) y aireación a 1 vvm con aire atmosférico (CO₂ estimado en 380 ppm).41²
- Gráfica 4.** Productividad obtenida para las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, UTEX 1230, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505 a las mismas condiciones de cultivo referenciadas en la Gráfica 3.43²
- Gráfica 5.** Perfiles de crecimiento de las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, UTEX 1230, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505. Medio BBM, Temperatura 25 ± 2 °C; iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm con fotoperiodo luz: oscuridad (12:12) y aireación a 1 vvm con 2% de CO₂ en la corriente de alimentación.46²
- Gráfica 6.** Comparación de Concentración celular (g/L) (a) y Productividad (b) en ensayos de Aire y Aire + CO₂48²
- Gráfica 7.** Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa ATCC 45754²
- Gráfica 8.** Diagrama de Pareto estandarizado para concentración celular (g/L) ..56²
- Gráfica 9.** Efectos principales para concentración celular.....57²

Gráfica 10. <i>Interacciones de los efectos</i>	57
Gráfica 11. <i>Superficie de respuesta estimada para concentración celular (g/L).</i> ..	58
Gráfica 12. <i>Efectos principales para productividad</i>	60
Gráfica 13. <i>Superficie de respuesta para Productividad (g/L.d)</i>	60
Gráfica 14. <i>Optimización de múltiples respuestas</i>	61
Gráfica 15. <i>Sobreposicionamiento para la optimización de la Concentración celular (g/L) y la Productividad (g/L.d)</i>	62
Gráfica 16. <i>Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa ATCC 588</i>	64
Gráfica 17. <i>Efectos principales para concentración celular</i>	66
Gráfica 18. <i>Superficie de respuesta para concentración celular (g/L)</i>	66
Gráfica 19. <i>Efectos principales para productividad</i>	68
Gráfica 20. <i>Superficie de respuesta para Productividad (g/L.d)</i>	68
Gráfica 21. <i>Contorno de la superficie de respuesta</i>	69
Gráfica 22. <i>Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa UTEX 90</i>	71
Gráfica 23. <i>Interacciones para los efectos Nitrato y Fosfato</i>	73
Gráfica 24. <i>Superficie de respuesta para concentración celular (g/L)</i>	73
Gráfica 25. <i>Efectos principales para productividad</i>	75
Gráfica 26. <i>Superficie de respuesta para productividad (g/L.d)</i>	75
Gráfica 27. <i>Contornos de la superficie de respuesta para productividad</i>	76
Gráfica 28. <i>Superficie de respuesta para la optimización de múltiples respuestas</i>	76

Gráfica 29. <i>Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa UTEX 2505</i>	78
Gráfica 30. <i>Diagrama de Pareto para concentración celular</i>	80
Gráfica 31. <i>Efectos principales para concentración celular</i>	80
Gráfica 32. <i>Interacción de efectos para concentración celular</i>	81
Gráfica 33. <i>Superficie de respuesta estimada para concentración celular</i>	82
Gráfica 34. <i>Efectos principales para productividad</i>	83
Gráfica 35. <i>Superficie de respuesta estimada para productividad (g/L.d)</i>	84
Gráfica 36. <i>Superficie de respuesta para la optimización de múltiples respuestas</i>	85
Gráfica 37. <i>Valores de concentración celular (g/L) (a) y productividad (g/L.d) (b) predichos y validados</i>	87

ECUACIONES

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento (μ en d^{-1})36

Ecuación 2 Tiempo de duplicación: (t_d , días)37

RESUMEN

La captura de carbono a través del cultivo de microalgas se presenta como un nuevo esfuerzo en la reducción de la concentración de CO₂ en la atmósfera. Las microalgas son microorganismos de rápido crecimiento con velocidad de biofijación de CO₂ relativamente alta, lo que le confiere una ventaja frente a otros sistemas biológicos para la captura de este compuesto. Por eso es necesario que dichos sistemas funcionen de manera eficiente, garantizando el trabajo con especies de microalgas adecuadas y optimizándolos por medio del control de los parámetros que son importantes para el éxito de estos procesos.

Dicho lo anterior se realiza un proceso de investigación para seleccionar cuatro especies de microalgas prometedoras en cuanto a captura de CO₂, bajo criterios de Producción de biomasa y Productividad, en donde se hizo necesario realizar ensayos de crecimiento con Aire y ensayos de crecimiento con Aire + CO₂ con el fin de determinar características de crecimiento y potencialidades en cuanto a los parámetros de selección establecidos. Fueron evaluadas en este estudio las cepas de microalgas provenientes de American Type Culture Collection: *Scenedesmus Obliquus* ATCC 457, *Scenedesmus armatus* ATCC 429, *Scenedesmus sp.* ATCC 464, *Chlorella kesslerii* ATCC 468, *Chlorella sp.* ATCC 853, *Chlamydomonas moewusii* ATCC 588 y de la Universidad de Texas: *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 y *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505.

Los resultados obtenidos en estos ensayos, determinaron que la mayor potencialidad en cuanto a la fijación de CO₂ la tenían las cepas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505, para las cuales se plantea un estudio de medios de cultivo, que permita encontrar los parámetros donde se maximiza la producción de biomasa de cada una de estas cepas, mediante la variación de las concentraciones de los compuestos NaNO₃ y K₂HPO₄ en el medio de cultivo.

El estudio de las condiciones de cultivo que maximizan la producción de biomasa y la productividad se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta, encontrando niveles óptimos para ambos parámetros dentro de la región experimental para las cepas ATCC 457, ATCC 588 y UTEX 2505, y en el caso de la cepa UTEX 90, los puntos de optimización, coinciden con un nivel de concentraciones evaluado dentro del estudio.

ABSTRACT

Carbon sequestration through the cultivation of microalgae is presented as a new effort to reduce the concentration of CO₂ in the atmosphere. Microalgae are fast growing microorganisms with CO₂ biofixation rate relatively high, giving it an advantage over other biological systems for the capture of this compound. Therefore it is necessary that these systems work efficiently, ensuring the work with suitable microalgae species and optimizing them through the control of the parameters that are important to the success of these processes.

Having said that, it takes a research process to select four species of microalgae promise for CO₂ capture, low biomass production standards and productivity, where it was necessary to do growth assays and growth assays Air with Air + CO₂ with the purpose of to determine growth characteristics and potential in terms of the selection parameters set. Were evaluated in this study microalgal strains from American Type Culture Collection: *Scenedesmus Obliquus* ATCC 457, *Scenedesmus armatus* ATCC 429, *Scenedesmus sp.* ATCC 464, *Chlorella kesslerii* ATCC 468, *Chlorella sp.* ATCC 853, *Chlamydomonas moewusii* ATCC 588 and from University of Texas: *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 and *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505.

The results obtained in these tests, determined that the major potential in terms of the CO₂ fixation strains have ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 and UTEX 2505, for which a new study of culture media that allows finding parameters which maximizes the production of biomass in each of these strains, by varying concentrations of the compounds NaNO₃ and K₂HPO₄ in the culture medium.

The study of the culture conditions to maximize the production of biomass and productivity was realized by response surface methodology, finding optimal levels

for both parameters within the region experimental for strains ATCC 457, ATCC UTEX 588 and 2505, and in the case of strain UTEX 90, optimization points coincide with a level of concentrations evaluated in the study.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cambio Climático y Gases de efecto invernadero (GEI)

El Cambio Climático Definido como el conjunto de grandes y rápidas perturbaciones provocadas por el aumento de la temperatura del planeta, el Cambio Climático está catalogado como el problema ambiental más importante al que se enfrenta la humanidad.

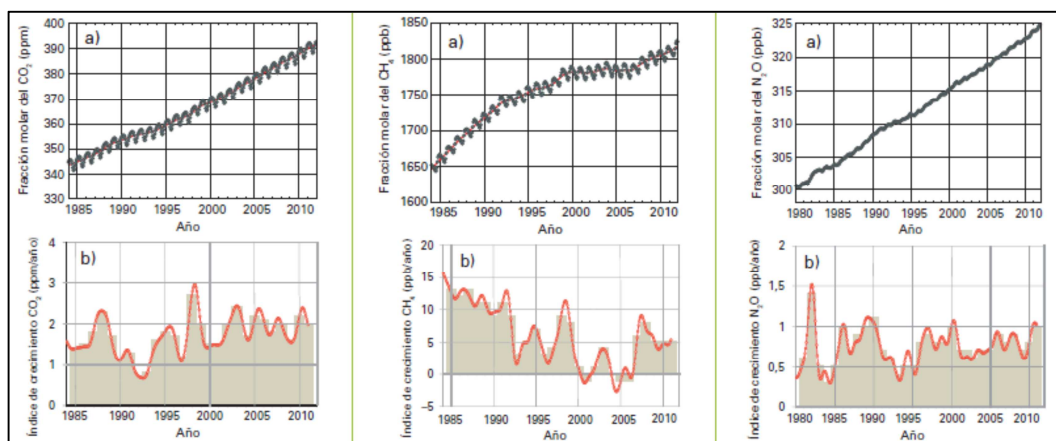
Según la Convención Marco de las Naciones Unidas el incremento de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) debidas a actividades antropogénicas, es la causa del aumento de la temperatura media en la Tierra (IPCC, 2005). Los principales GEI responsables del aumento de temperaturas son: dióxido de carbono, metano, óxidos de nitrógeno y un grupo de compuestos gaseosos que contienen cloro y flúor, como halogenuros de carbono, perfluorocarburos y hexafluoruro de azufre. Entre dichos gases, el CO₂ es en la actualidad, el GEI más presente en la atmósfera y representa en torno al 64 por ciento del total de las causas de variación del clima (OMM, 2011).

La Organización Meteorológica Mundial (OMM) indicó que entre 1990 y 2010 hubo un incremento del 29 por ciento en la fuerza de irradiación (el efecto del calentamiento atmosférico en el clima) derivada de los GEI y que el dióxido de carbono (CO₂) es el responsable del 80 por ciento de ese aumento. Desde el principio de la era industrial en 1750, según la OMM, su presencia en la atmósfera ha aumentado en un 39 por ciento, y la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica de Estados Unidos (NOAA, por sus siglas en inglés) anunció que por primera vez en la historia, el nivel de dióxido de carbono en la atmósfera (CO₂) superó las 400 partes por millón, indicando un récord de emisión de GEI y enfatizando en la necesidad de emplear mecanismos para detener el aumento en

dichas emisiones y contener las transformaciones y cambios sobre el sistema climático y ambiental del planeta (NOAA, 2013).

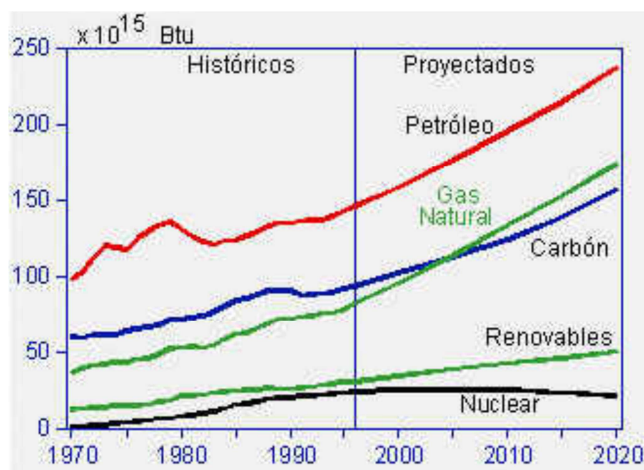
1.2. Evolución de las emisiones

Desde la revolución industrial la combustión de productos orgánicos (entre ellos los derivados del petróleo) junto a la deforestación causada por la actividad humana han incrementado en gran medida el nivel de concentración de CO_2 en la atmósfera. Alrededor de las emisiones de CO_2 (96.5%) provienen de los combustibles fósiles, los cuales son la fuente de energía más utilizada en el mundo, donde el 86% de la energía procede de fuentes fósiles y su combustión es responsable del 75% de las actuales emisiones antropogénicas. El consumo de energía primaria creció una media de un 1,4% anual desde 1990 a 1995. Durante ese mismo periodo las emisiones de CO_2 globales aumentaron, ratificando al dióxido de carbono (CO_2) como gas de efecto invernadero antropogénico (Gráfica 1) más abundante en la atmósfera (OMM, 2012)



Gráfica 1. Promedio mundial de la fracción molar de los gases de efecto invernadero de larga duración CO_2 , CH_4 y N_2O respectivamente (a) y el índice de crecimiento para cada uno (b) desde 1984 hasta 2011. El índice de crecimiento medio se muestra mediante columnas en (b) (OMM, 2012)

Las proyecciones indican que la demanda energética en el mundo crecerá un 58% de 2001 a 2025. Este incremento en el consumo energético será motivado principalmente por los países en vías de desarrollo, siendo los de la zona asiática los que experimenten un aumento mayor y pasen a consumir el doble de la energía que consumen en la actualidad. Si estas predicciones se cumplen, el aumento de emisiones mundiales de dióxido de carbono será substancial, incluso cuando los países industrializados realicen grandes esfuerzos por reducirlas (International Energy Outlook, 2003).



Gráfica 2. Consumo mundial de energía primaria anual (Cuatrillones de Btu/año, 1 cuatrillón=1015 Btu) por las diferentes fuentes, desde 1970 a 2001 y su predicción hasta 2025. (International Energy Outlook 2003).

1.3. Sistemas de captura y reducción del CO₂

Existe una gran variedad de tecnologías desarrolladas y otras en proceso de desarrollo con el objetivo de reducir las emisiones y concentraciones de CO₂ en la atmósfera. Una opción de mitigación de GEI se define como cualquier acción que dé como resultado una reducción en las emisiones de un sector determinado, por

ejemplo, la eficiencia energética, que reduce el consumo de electricidad y, en consecuencia, la quema de combustibles necesaria para generarla. Los objetivos de reducción, los costos, el potencial de cada tecnología, el impacto ambiental asociado, y factores sociales, como la aceptación pública, serán determinantes para la elección de la tecnología más adecuada a cada situación concreta. Según el IPCC las opciones de reducción son (IPCC, 2005):

- Mejora de la eficiencia energética en aspectos de conversión, transporte y uso final de la energía.
- Transición de tecnologías basadas en el carbón a tecnologías basadas en gas natural para la producción eléctrica.
- Aumento de las fuentes de energía de baja emisión, es decir renovables y nuclear. Como estrategia para cubrir parte de la demanda energética del futuro.
- Captura y secuestro de CO₂ (CCS, CO₂ Capture and Sequestration). Captura el CO₂ y posterior almacenamiento en el subsuelo.
- Secuestro de CO₂ en sumideros naturales o biológicos, como son las plantas y los océanos.

Las opciones propuestas por el IPCC están divididas en dos grupos, el primero de ello reúne aquellos mecanismos que evitan las emisiones de CO₂ y las que permiten fijar o eliminar el CO₂, como lo es la captura y la implementación de sumideros naturales o biológicos, que para efectos de este trabajo, son las más pertinentes a discutir.

1.3.1. Captura de CO₂ mediante sistemas biológicos

La fijación biológica del CO₂ se lleva a cabo por los procesos fotosintéticos de todas las plantas terrestres y un enorme número de microorganismos fotosintéticos (Skjanes *et al.*, 2007) .

La captura de CO₂ por los ecosistemas vegetales terrestres constituye un componente importante en el balance global de Carbono (C). A escala mundial se considera que la biosfera terrestre fija cerca de 2.000.000 toneladas/año (UNESA, 2005). Este valor es resultado de la diferencia entre la absorción fotosintética de CO₂ y las pérdidas por respiración, por descomposición de la materia orgánica y por perturbaciones de diferente naturaleza. A este valor le se denomina producción neta de la biosfera (PNB), y es la cantidad que a largo plazo queda almacenada en el sumidero (UNESA, 2005). Sin embargo, las plantas parecen contribuir sólo con el 3-6% de las emisiones globales de CO₂ en el planeta (Skjanes *et al.*, 2007), mostrando en este sentido, menor eficiencia que los procesos de captura llevados a cabo por microalgas y cianobacterias, quienes reportan una eficiencia de fijación de CO₂ aproximadamente entre 10-50 veces mejor que las plantas (Costa *et al.*, 2000). Los sistemas de captura que involucran microalgas y cianobacterias, además de su eficiencia, revisten importancia gracias a que crecen rápidamente, fijan las mayores cantidades de CO₂ del planeta (González., *et al* 2011), contienen compuestos valiosos y son cosechadas de manera fácil (Cheng *et al.*, 2006)

Cuando se combina la captura de CO₂, la producción de biocombustibles, y el tratamiento de aguas residuales con sistemas de microalgas, se ofrece una alternativa bastante prometedora para las actuales estrategias de mitigación de CO₂ (Wang *et al.*, 2008) .

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas de captura de CO₂ con microalgas necesitan tener en cuenta ciertas consideraciones que hagan más eficientes dichos procesos, entre estas se encuentran: la especie de microalga, la proporción de nutrientes en el medio, la intensidad lumínica, el pH, la temperatura y el porcentaje de CO₂ utilizado en el gas de alimentación (Toledo-Cervantes *et al.*, 2013). La eficiencia en la fijación del CO₂ en los cultivos, es directamente proporcional a la velocidad de crecimiento de las microalgas (González *et al.*, 2009) y aunque muchos estudios previos se han centrado en la identificación de aquellas especies de microalgas que puedan tolerar altas concentraciones de CO₂, también se ha probado la capacidad de fijación en sistemas de cultivo con inyección sólo de aire o alimentado con bajas concentraciones de CO₂ (Ramanan *et al.*, 2010), buscando aquellas condiciones que favorezcan la producción celular y la eficiencia de dichos sistemas.

Como se ha mencionado, los componentes del medio desempeñan un rol esencial en el funcionamiento de los cultivos, pues deben cumplir con los requerimientos para el crecimiento y la formación de productos, suministrando energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular (Cheng *et al.*, 2013). De esta manera se establecen cultivos dirigidos a la producción celular, mejorando los niveles de productividad y proporcionando una biomasa enriquecida con compuestos de interés comercial (Ortega *et al.*, 2004)

De aquí la importancia de investigar y desarrollar nuevas formulaciones respecto a medios sintéticos que puedan modelar de manera directa el crecimiento de las diferentes especies de microalgas, mediante la modificación de ciertos compuestos en medios específicos para crecimiento, como puede ser la variación de nutrientes fundamentales como el fósforo y el nitrógeno, dos compuestos principales en la nutrición de este tipo de microorganismos y que afectan

directamente el crecimiento celular e influyen la producción de otro tipo de compuestos. De este modo, evaluar la manera en que la disponibilidad o deficiencia e interacción de ambos nutrientes direcciona el crecimiento en los sistemas de producción, es importante para determinar formulaciones específicas que según las necesidades y disposición de recursos económicos puedan permitir el logro y cumplimiento de las expectativas de producción y la optimización de los sistemas de cultivo, centrando los esfuerzos en mejorar la eficiencia de los procesos (González-López et al., 2011)

3. JUSTIFICACIÓN

Parte de las emisiones de GEI, específicamente las provenientes de las actividades desarrolladas por el hombre, como es el caso de la quema de combustibles fósiles, aportan alrededor del 75 % del CO₂ y gran parte del metano y del óxido nitroso presente en la atmósfera (IPCC, 2005). Debido a la enorme magnitud de dichas emisiones, es preciso implementar técnicas y alternativas que permitan desarrollos para la reducción de tales emisiones, que en conjunto con las tecnologías alternas en cuanto a la generación de energías renovables y la eficiencia en los procesos, permitan la captura del CO₂ y su posible valorización dentro de otro tipo de procesos (IPCC, 2005)

La tecnología de captura de CO₂ mediante el cultivo de microalgas, se presenta como una alternativa eficiente en la transformación de este compuesto en productos de alto valor aplicables a amplios sectores de la producción, sumado a su gran potencial en la generación de nuevas formas de energía (Skjånes, 2007). Esto le confiere a las microalgas ciertas ventajas a la hora de ser elegidas como aplicaciones biotecnológicas para el cumplimiento de tal objetivo; donde la investigación en cuanto a la manera de volver más eficientes los sistemas de crecimiento, se traduce en un aporte importante en el desafío global de reducir y mitigar los efectos negativos causados por las altas concentraciones de CO₂ presentes en la atmósfera.

Participar de un desafío global como es la reducción de GEI mediante procesos biológicos con microalgas generando información que permita conseguir eficiencia y productividad en los sistemas de crecimiento.

En este contexto, el estudio de los principales agentes que regulan el funcionamiento y producción en los cultivos de estas especies desempeña un

papel importante para el avance del conocimiento de los sistemas de producción y de los factores directamente asociados a la generación de biomasa y de otro tipo de compuestos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la producción de biomasa y la productividad a partir de la variación en el medio autotrófico de la concentración de NaNO_3 y K_2HPO_4 , para cuatro cepas de microalgas seleccionadas experimentalmente en estudios con aire y aire enriquecido con CO_2 .

4.2. Objetivos Específicos

- 4.2.1. Diseñar un protocolo para el mantenimiento y conservación de las especies de microalgas estudiadas que permita el trabajo y disponibilidad de células viables
- 4.2.2. Evaluar el crecimiento de 9 cepas de microalgas por medio de ensayos con aire y aire enriquecido con CO_2 , para seleccionar las cuatro mejores especies bajo criterios de producción de biomasa y productividad.
- 4.2.3. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de NaNO_3 y K_2HPO_4 en el medio de cultivo, sobre el crecimiento de las cuatro especies de microalgas seleccionadas a una concentración fija de CO_2
- 4.2.4. Validar experimentalmente los valores de producción de biomasa y productividad con base en las condiciones de concentración de NaNO_3 y K_2HPO_4 , resultado del análisis estadístico en el estudio de medios de cultivo.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Microalgas

Las microalgas definen a un grupo muy amplio de microorganismos fotosintéticos, catalizadores del proceso de fijación del CO₂, convirtiéndolo en materia orgánica. Abundan en los océanos, lagos, ríos y arroyos, donde forman el llamado fitoplancton; la mayoría son fotoautótrofas aunque, algunas formas son heterótrofas facultativas u obligadas, y unas cuantas son fagotróficas (Chisti, 2007).

Pueden clasificarse como procariotas y eucariotas. Las microalgas procariotas o Cyanobacterias tienen ribosomas más pequeños y no poseen organelos limitados por membrana. Lo que define a las microalgas eucariotas es la presencia de cloroplastos y una doble membrana en el núcleo. Algunas especies de microalgas poseen mecanismos de locomoción como flagelos y flujos de mucilago a través de poros en la pared, esta es una condición característica de las microalgas que forman colonias. Las especies unicelulares en la mayoría de los casos no tienen movilidad (Graham y Wilcox, 2000).

Las microalgas muestran alta capacidad fotosintética y al igual que las plantas terrestres, a través de la fotosíntesis, fijan el CO₂ atmosférico como parte de sus procesos metabólicos básicos. Esto las hace responsables de al menos el 80% de la actividad fotosintética del planeta (Chisti, 2007)

Estos microorganismos tienen ciclos de vida cortos y con frecuencia involucran la formación de esporas de resistencia, lo que les permite vivir durante periodos desfavorables. Su nutrición se da básicamente por la absorción en forma iónica de Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Potasio, Calcio, Hierro,

Magnesio, y de otros compuestos como Manganeso, Boro, Cobalto, Cobre, Zinc y Molibdeno en cantidades traza. Sin embargo, para algunas especies son necesarias otras moléculas inorgánicas y orgánicas complejas, incluyendo la vitamina B12 (Lara *et al.*, 1996).

5.1.1. Composición

La versatilidad del metabolismo de las microalgas las hace extremadamente interesantes; además de ser la biomasa que presenta un crecimiento más rápido, su cultivo controlado supone ventajas relativas a su capacidad de almacenamiento de CO₂, acumulación de moléculas de alto valor comercial y aplicación en la industria como es el caso de los lípidos (empleados en la producción de biodiesel, fitometabolitos para la industria farmacéutica, carbohidratos y proteínas como base alimenticia de ciertos animales, entre otros; además de su amplio uso en la remediación y depuración de efluentes industriales altamente contaminados.

Como las microalgas poseen estructuras sencillas su composición consiste básicamente en carbohidratos, proteínas y lípidos, aunque también son fuente de vitaminas como la A, B1, B2, B6, C, y E. Respecto al contenido de carbohidratos las formas más comunes en las que se encuentran son glucosa, almidón y variedad de polisacáridos altamente digestibles.

El contenido de lípidos tanto para su uso en alimentos como para la producción de biocombustibles puede variar entre rangos de 1 - 35% y 20 - 80% respectivamente. La producción de los compuestos potencialmente útiles a partir de microalgas están estrechamente ligados a factores de tipo ambiental, el sistema de cultivo y los métodos de cosecha (Satyanarayana *et al.* 2011).

Otro factor fundamental en la composición bioquímica de las especies y la productividad en los cultivos es la composición del medio y la disponibilidad de los

nutrientes que determinan la inhibición o crecimiento de la biomasa. La optimización de los niveles de nutrientes fundamentales para el crecimiento, la intensidad de luz, la salinidad, temperatura y el pH pueden repercutir en la obtención de mayores niveles de productividad en los cultivos. (Brennan y Owende, 2010).

5.1.2. Aplicaciones de las microalgas

Las microalgas han comenzado a desempeñar un papel importante en la biotecnología gracias a la amplia variedad de metabolitos con alto valor comercial. Entre sus aplicaciones se encuentran el uso en la industria alimenticia, agregando valor nutricional en alimentos, amplia utilidad en la acuicultura, en la industria cosmética y en la obtención de fármacos. Además de esto, son fuente para la obtención de biocombustibles renovables gracias a los altos contenidos lipídicos en su estructura, a la alta eficiencia fotosintética y a su rápida velocidad de crecimiento (Chisti, 2007).

De otro lado, las microalgas se presentan como una alternativa fuerte en los sistemas biológicos de mitigación y reducción de los problemas ocasionados por el incremento en los niveles de CO₂ y sus implicaciones en la dinámica terrestre como el cambio climático. Esta ventaja frente a otros sistemas naturales, tiene que ver con su habilidad de fijar CO₂ atmosférico y su fijación por medio de la energía solar con una eficiencia de 10 a 50 veces mayor que las plantas terrestres (Li *et al.*, 2008). La estrategia de utilizar microalgas para la reducción de CO₂ ofrece ciertas ventajas: 1) tienen altas tasas de crecimiento y habilidad para fijar CO₂ en comparación con las plantas forestales, agrícolas y acuáticas (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008), 2) permiten reciclar el CO₂ ya que el dióxido de carbono es convertido en energía química vía fotosíntesis, lo cual puede ser convertido en combustibles utilizando tecnologías existentes y 3) la mitigación del CO₂ por reacción química

requiere de energía y costos de proceso, y el único incentivo económico son los créditos de CO₂ que se generan en el marco del Protocolo de Kyoto. Por otra parte, la mitigación biológica de CO₂ utilizando microalgas, podría ser rentable al combinarse con la producción de biocombustibles, tratamiento de aguas residuales o la obtención de productos de alto valor agregado (Wang *et al.*, 2008)

5.2. Fijación del CO₂

Las microalgas normalmente crecen suspendidas en medio acuático realizan los mismos procesos fotosintéticos que las plantas superiores terrestres, es decir, utilizan la energía solar para convertir el agua y el CO₂ en biomasa y oxígeno. Las microalgas presentan ventajas únicas frente a otros organismos capaces de fijar CO₂ (Benemann, 2003):

1. Pueden utilizar directamente el CO₂ proveniente de una corriente de gases de combustión sin necesidad de que sea tratado previamente.
2. Poseen un potencial de productividad mucho mayor que el de las plantas superiores y otras plantas acuáticas.
3. Para su producción en sistemas de cultivo abiertos se pueden aprovechar recursos no adecuados para la agricultura, como aguas residuales, marinas, suelos arcillosos y salinizados por lo que respecto a los usos del suelo y del agua no compiten con la agricultura.
4. Los tiempos de generación celular (td, el tiempo necesario para que un alga se duplique), son de un día o menos, permitiendo el desarrollo de procesos de producción más rápidos.

5.2.1. Fotosíntesis y fijación del CO₂

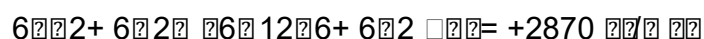
Las microalgas son individuos unicelulares o pluricelulares cuyas células funcionan independientemente, realizando todas las funciones vitales. Obtienen su energía gracias a su capacidad para realizar la fotosíntesis.

La fotosíntesis, proceso por el cual el agua se descompone en oxígeno y un agente reductor necesario para la reducción de CO₂ a carbono orgánico, es un mecanismo complejo y muy eficiente, resultado de varios millones de años de evolución. Este proceso es realizado por cianobacterias (procariotas), microalgas (eucariotas), macroalgas y plantas superiores.

Como todos los organismos fotosintéticos, las algas utilizan el CO₂ como fuente de carbono. En ausencia de este compuesto prácticamente no hay crecimiento, o hay una limitante en la productividad cuando el suministro de este compuesto es deficiente. Según la composición química media de la biomasa de las algas, se necesitan 1.8 toneladas de CO₂ para producir una tonelada de biomasa (Becker 1994).

Del proceso fotosintético, las microalgas obtienen la energía necesaria para llevar a cabo la síntesis de carbohidratos y como vía de captura y fijación del carbono y oxígeno presentes en la atmósfera.

Energía luminosa



El proceso global está compuesto por dos subprocesos en todos los organismos fotosintéticos: el primero está constituido por una serie de pasos denominados reacciones luminosas, donde se utiliza la energía de la luz solar para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del H₂O, con esta oxidación se consigue primero que el

agente oxidante NADP^+ se reduzca a NADPH , produciendo equivalentes reductores y la liberación del O_2 , y además que la energía luminosa se capture mediante la fotofosforilación. En el segundo subproceso llamado reacciones oscuras de la fotosíntesis, el NADPH y el ATP producidos por las reacciones luminosas se utilizan para la síntesis reductora de los carbohidratos a partir del CO_2 y el agua (Mathews y van Holde, 2005)

Todas las microalgas utilizan el carbono inorgánico para sintetizar componentes orgánicos. Estudios detallados, acerca de la incidencia de la fuente de carbono en la productividad de las microalgas, destaca que el HCO_3^- es una fuente de carbono fácilmente asimilable por las células, pero pobre comparada con el aporte de carbono por parte del CO_2 (Carvalho *et al.*, 2006). El contenido de CO_2 en el aire es de 380 ppm, lo que representa que es una fracción muy pequeña que la que se transfiere al medio de cultivo, por lo que se buscan fuentes alternativas de suministro de este compuesto, ya sea en forma de gas puro o como gas resultado en un proceso de combustión. (Carvalho *et al.*, 2006).

El CO_2 que es tomado por las células se incorpora de inmediato al ciclo de Calvin por la enzima Rubisco, donde se obtiene como metabolito intermediario al ácido 3-fosfoglicérico (PGA) para posteriormente participar en la síntesis de macromoléculas tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

En las reacciones luminosas de la fotosíntesis se produce ATP y NADPH importantes en la síntesis de carbohidratos, proceso que se da en el ciclo de Calvin a través de la fase carboxilativa, reductiva y regenerativa.

5.3. Cultivo de microalgas

Las microalgas tienen requerimientos mínimos de cultivo tanto nutricionales como físicos. En los primeros se encuentra el medio de cultivo y su composición, de este depende la producción de biomasa y metabolitos, en los segundos se tienen factores como la intensidad lumínica, el fotoperiodo, la temperatura y el pH, que pueden de igual manera afectar el comportamiento de la microalga (Qin, 2005).

La disponibilidad de nutrientes en el medio, sumado a la fuente de energía son aspectos fundamentales para la reproducción, el mantenimiento celular y la biosíntesis de los compuestos necesarios para el crecimiento. Las necesidades nutricionales están directamente relacionadas con la disposición de macronutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio y azufre, micronutrientes como hierro, cobre, molibdeno, manganeso, sodio, cobalto, vanadio y silicio, y en algunos casos, por la presencia de factores de crecimiento como las vitaminas del complejo B (biotina, tiamina y cianocobalamina) (Zaborsky *et al.*, 1983).

5.3.1. Macronutrientes

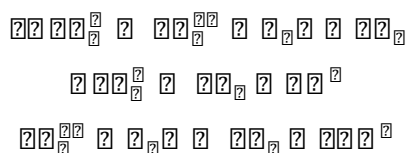
Los macronutrientes son esenciales para las microalgas en cantidades de gramos por litro en el medio de cultivo (g/L). Cumplen su función, principalmente en la síntesis de compuestos celulares que forman parte de las estructuras algales. Para estimar los requerimientos mínimos de estos nutrientes se puede emplear la fórmula aproximada de la biomasa $CH_{1,83}O_{0,48}N_{0,11}P_{0,01}$ (Chisti, 2007).

5.3.1.1. Fuente de carbono

El macronutriente más importante es el carbono, puede suministrarse al cultivo en forma orgánica o inorgánica. La fuente principal de carbono inorgánico es el CO₂ empleado para el crecimiento celular bajo condiciones fotoautotróficas, aunque algunas microalgas pueden utilizar compuestos orgánicos como la glucosa en condiciones de cultivo heterotróficas o mixotróficas. Generalmente, el CO₂ se suministra al cultivo mezclado con aire (Abalde *et al.*, 1995) y además de servir como fuente principal para la nutrición microalgal, representa el método de control y mantenimiento de los niveles óptimos de pH para los cultivos, a través del sistema de equilibrio



El sistema bicarbonato-carbonato puede aportar CO₂ para la fotosíntesis mediante las siguientes reacciones:



Estas reacciones permiten que durante la fijación fotosintética del CO₂ se acumule HCO_3^- en el medio provocando un aumento del pH.

5.3.1.2. Fuente de Nitrógeno

Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa. La respuesta típica a la limitación de este nutriente es

la decoloración celular y la acumulación de compuestos orgánicos como polisacáridos y ciertos aceites (Converti *et al.*, 2006) El suministro de este compuesto puede hacerse al medio como nitrato, amoníaco y úrea y aunque el nitrito también puede ser utilizado, éste alimentado en altas concentraciones puede ser tóxico para las microalgas. (Kaplan *et al.*, 1986). En especies de microalgas como *Chlorella* y *Scenedesmus* se ha observado su capacidad de crecer en cualquier fuente de nitrógeno (Q. Lin, J. Lin: 2010).

Una consideración importante en los sistemas de cultivo que permitan alcanzar altos rendimientos en la producción de masa celular es garantizar la alimentación adecuada de este nutriente.

La mayoría de las algas verdes son capaces de sintetizar todos los compuestos nitrogenados que requieren para su crecimiento a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico, como los mencionados anteriormente. Donde este compuesto tiene incidencia directa en la formación de ácidos nucleicos y proteínas (A. Converti *et al.*, 2006).

Asimilación del Nitrógeno inorgánico

La asimilación del nitrógeno inorgánico la realizan los microorganismos y las plantas superiores y constituye uno de los procesos claves en el ciclo del nitrógeno en la biosfera.

Las formas inorgánicas de este elemento en la naturaleza poseen estados de oxidación que van desde (+5) en el nitrato hasta (-3) en el amonio, pasando por el nitrógeno molecular (0), dichas formas son asimiladas por los organismos citados y constituyen, bajo el punto de vista cuantitativo, un movimiento de 2×10^4 megatoneladas de nitrógeno por año.

La asimilación del nitrato en microalgas eucariotas incluye 3 procesos fundamentales:

1. Transporte de nitrato al interior de la célula, que es dependiente de la energía metabólica y está mediado por permeasas específicas (Florencio y Vega, 1982; Ullrich, 1987)
2. Reducción de nitrato hasta amonio, que se consigue por la acción consecutiva de la nitrato reductasa (NiR), es independiente de ATP y requiere 8 electrones (Guerrero *et al*, 1981)
3. Incorporación de amonio a esqueletos carbonados, como grupo α -amino del glutamato, es un proceso catalizado por el ciclo glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT), el cual sintetiza una molécula neta de glutamato con el concurso de 1 ATP y 2 electrones (Guerrero *et al*, 1981).

Es importante destacar que además del amonio primario, que es aquel que procede de la reducción de nitrato o que se toma directamente del medio, también se origina en microalgas amonio intracelular por descarboxilación de glicina (Foto respiración), o por degradación de proteínas, seguida de desanimación y desamidación de aminoácidos. El amonio así formado se recicla por medio de la ruta GS-GOGAT (Guerrero *et al*, 1981)

5.3.1.3. Fuente de fósforo

Requerido para el crecimiento microalgal y la formación del ADN y el ARN, el fósforo es usualmente suministrado en exceso en forma de fosfatos ya que éstos forman complejos con los iones metálicos, ocasionando que no todo el fósforo esté disponible para la producción de biomasa (Chisti, 2007). Al igual que el nitrógeno, hay reportes de mayores acumulaciones de lípidos con una limitación de fósforo (Xin *et al*, 2010).

Es el principal nutriente requerido para el crecimiento normal de las microalgas, la formación de ADN y ARN; en concreto para todos los procesos celulares donde se metabolizan los carbohidratos y donde se da la transformación y transferencia de energía (Waites *et al.* 2001).

Su asimilación es dependiente de la energía generada en la fotosíntesis y en la respiración microalgal. Cantidades menores a 50 $\mu\text{g/l}$ limitan el crecimiento de las algas verdes y su nivel óptimo está entre 100 y 2000 $\mu\text{g/l}$ (Spreitzer *et al.* 2002). Similar a lo que sucede con el nitrógeno, la limitación del fósforo sugiere mayor acumulación de lípidos en las células

5.3.1.4. Fuente de Hierro

Este es un elemento importante para el crecimiento de las células, ya que juega un papel fundamental en el metabolismo, siendo constituyente de los citocromos. Es usado para el transporte de electrones, reducción de nitritos y nitratos, además participa en la asimilación del nitrógeno como parte funcional de la ferredoxina y afecta la síntesis de ficocianina y clorofila. El requerimiento de hierro depende de la fuente de nitrógeno; es más alto cuando se utiliza el ión nitrato en lugar del ión amonio (Watanabe, 2005). Su requerimiento también aumenta con la disminución de la intensidad de luz y decrece con el aumento de la duración del fotoperiodo.

La coloración amarilla en cultivos de microalgas es un indicador de la deficiencia del hierro en el medio, sin embargo un exceso de éste inhibe el crecimiento de la biomasa de microalgas (Serrano *et al.*, 2011)

5.3.1.5. Fuente de Magnesio

El magnesio es un constituyente indispensable de la molécula de clorofila y cofactor de diversas enzimas asociadas con la fotosíntesis y la respiración, sobre todo en los procesos de fosforilación. Una de esas enzimas importantes es la Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) que cataliza el primer paso de la red fotosintética de la asimilación del CO₂ atmosférico y de la oxidación del carbono en la foto-respiración (Spreitzer, 2002). Se ha comprobado sobre un extracto crudo de *Dunaliella tertiolecta* (Clorofita) que la actividad de Rubisco ha sido regulada como respuesta a la concentración de Mg⁺² en forma de MgCl₂ y que conforme aumenta la concentración de éste, aumenta la actividad enzimática, mostrando la mayor actividad a una concentración 20 mM de MgCl₂ (MacIntyre *et al.* 1997).

5.3.2. Micronutrientes

Los micronutrientes son requeridos por las microalgas en cantidades de miligramos por litro (mg/L) o microgramos por litro en el medio de cultivo (µ/L). Tienen especial importancia en el adecuado funcionamiento de las células (Barsanti *et al.*, 2006).

Éstos hacen parte de enzimas necesarias para el transporte de electrones, la fijación y transporte del CO₂, la transcripción del ADN y la fijación y transporte del nitrógeno, entre otras (Watanabe, 2005)

5.3.2.1. Fuente de Silicio

Después del oxígeno, éste es el segundo elemento más abundante; representa alrededor de una cuarta parte de la masa terrestre como dióxido de silicio y varios silicatos. Los organismos fotosintéticos utilizan este compuesto en su forma de

ácido ortosilícico. El silicio tiene un efecto positivo en el crecimiento de diatomeas, pero afecta de manera negativa la producción de lípidos en estas especies. En las especies de algas en general, la deficiencia de este compuesto afecta la incorporación de fósforo y de azufre en las células. Otro aspecto tiene que ver con la disminución en la capacidad fotosintética de las células, lo cual modifica la síntesis de lípidos y de carbohidratos, es decir su composición bioquímica (Coombs *et al.* 1967, Coradin *et al.* 2006).

5.3.2.2. Fuente de Manganeso

El manganeso es de vital importancia en los procesos fotosintéticos llevados a cabo por las células entre estos la síntesis de clorofila y la utilización del O_2/CO_2

5.3.3. Elementos traza

Los medios de cultivo empleados en el crecimiento de microalgas requieren ciertas trazas de elementos como el cobalto y zinc, incorporados en la estructura y síntesis del ARN. Otros elementos como boro y cobre son utilizados por las células para la realización de la fotosíntesis y en la asimilación y reducción de nitratos, el elemento traza más importante es el molibdeno (Li *et al.* 2006).

5.3.4. Vitaminas, proteínas y otros cofactores en el crecimiento

Algunas microalgas presentan un requerimiento de pequeñas cantidades de vitaminas, principalmente del complejo B. Los atributos nutricionales de las microalgas dependen en gran medida de factores intrínsecos, como su

composición bioquímica, tamaño, digestibilidad de la pared celular y su baja toxicidad (Carvalho *et al.* 2006).

5.3.5. Factores externos involucrados en el crecimiento

Para el crecimiento de cualquier organismo fotosintético se requiere luz, CO₂, agua, nutrientes minerales en solución y una temperatura ambiente adecuada para la actividad metabólica.

Cuando el suministro de CO₂ y agua no son limitantes, factores como la temperatura, iluminación, turbulencia, viscosidad y la tasa de renovación del agua son importantes para las microalgas. Todas las especies tienen rangos óptimos de desarrollo según las características de luz y temperatura; cuando estos factores cambian, las poblaciones existentes adaptadas a estas condiciones disminuyen o incluso desaparecen y son sustituidas por otras especies adaptadas a las nuevas características (Barsanti *et al.*, 2006).

5.3.5.1. Iluminación

La actividad fotosintética de las microalgas es un proceso que depende de la cantidad y la calidad de luz utilizada en los cultivos. Este puede convertirse en un factor limitante en la producción de biomasa y de otros compuestos (Perner-Perner-Nochta *et al.*, 2007)

Cuando se habla de iluminación, se deben contemplar dos factores: La irradiancia, que se refiere al flujo de luz por unidad de área a la cual están expuestas las microalgas, y el fotoperiodo, el cual es la cantidad de horas durante el día en la que las microalgas son sometidas a dicha irradiación (L. Barsanti y Gualtieri, 2006). La luz utilizada por las microalgas está en el intervalo de 300 a 700 nm,

conocida como radiación fotosintéticamente activa; la cual constituye alrededor de un 43% de la radiación solar total y su energía es equivalente a la de la luz monocromática a 575 nm. En algunos casos, la irradiación a la cual se somete los cultivos de microalgas puede causar fotoinhibición, cuando las antenas que son los componentes celulares encargados de la absorción de la energía lumínica se dañan por acción del exceso de esta en el sistema (Perner-Nochta *et al*, 2007).

Cuando se emplea irradiación artificial, el fotoperiodo hace referencia a los ciclos de iluminación expresados en horas de Luz: Oscuridad los cuales pueden ir desde 12:12 , 18:6 y 14:10 (Barsanti y Gualtieri, 2006). El período de iluminación puede ajustarse de acuerdo a los objetivos del cultivo: el fotoperíodo continuo (horas de iluminación prolongada) produce crecimientos rápidos y un fotoperíodo con horas de luz y oscuridad semejante al fotoperíodo solar mantiene un crecimiento normal y saludable. (Sunda y Huntsman. 2004).

5.3.5.2. Temperatura

La temperatura es otro parámetro fundamental para el crecimiento de las microalgas. La biomasa microalgal al igual que la de otros microorganismos responde continuamente a valores claves de temperatura: una temperatura mínima, aproximadamente 16°C, por debajo de la cual no es posible el crecimiento; una temperatura óptima, entre 16 y 27°C dependiendo de la microalga, a la que se produce el crecimiento más rápido y una temperatura máxima, cercana a los 35°C, por encima de la cual no es posible el crecimiento, dado que algunas proteínas pueden sufrir daños irreversibles (Madigan, *et al.*, 1999).

Los cultivos de microalgas que crecen por debajo de la temperatura óptima generalmente son más sensibles a la fotoinhibición que aquellos que se mantienen en el valor ideal. La temperatura de crecimiento también afecta la composición

bioquímica de las células (Barsanti y Gualtieri, 2006); se ha encontrado que a temperaturas entre 20°C y 25°C hay un óptimo en la producción de lípidos en especies de microalgas como *Nannochloropsis*, *Chlorella* o *Scenedesmus*, reflejando lo contrario a temperaturas mayores (Converti *et al.*, 2009).

5.3.5.3. pH

Respecto al pH, las microalgas cultivadas muestran una alta dependencia a este parámetro donde se registra un óptimo bien definido, el cual se encuentra apenas por encima de la neutralidad, por lo que son clasificados como microorganismos neutrófilos. En sistemas de cultivos cerrados el pH tiende a variar debido al consumo de algunos nutrientes y al CO₂ que se solubiliza y consume; para evitar esto, se emplean tampones. El tampón más común es el de fosfatos que funciona bien a valores de pH cercanos a 7 (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Sin embargo, las microalgas pueden soportar más fácilmente un aumento en el pH, que una disminución de este en el medio, esta es una condición fatal para ellas (Abalde *et al*, 1995), sin embargo pueden presentar inhibición a un pH de 11 en adelante (Chowdhury *et al*, 1995).

La dependencia de las microalgas al pH se debe a que existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de su membrana celular, ya que esta no es libremente permeable, por lo que las concentraciones de hidrogeniones intra y extracelulares no están necesariamente en equilibrio (Abalde *et al*, 1995).

5.3.5.4. Agitación

La agitación se vuelve un parámetro fundamental para obtener altos rendimientos en la producción de biomasa, cuando los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales ya han sido garantizadas. En sistemas cerrados, la aireación cumple con el objetivo fundamental de garantizar que las células permanezcan en suspensión, con el fin de que siempre estén en contacto con la luz, tanto en la superficie del fotobiorreactor como a través de las paredes transparentes. Entre otros aspectos importantes, la agitación facilita la homogeneización de nutrientes en el medio y elimina los gradientes ya sea salinos, térmicos o de concentración respecto a los volúmenes de trabajo en los cultivos. Un adecuado mezclado favorece una distribución homogénea de las células, de los metabolitos, el calor y la transferencia de gases a través de la interfase gas-líquido (Abalde *et al.*, 1995).

5.4. Métodos de cultivo

El cultivo de microalgas se puede realizar de varias maneras, en sistemas cerrados como fotobiorreactores o en estanques abiertos. Cuando el cultivo se realiza en sistemas cerrados, es posible controlar variables como la iluminación, la temperatura, los parámetros nutricionales y la contaminación; mientras que la producción de biomasa en estanques abiertos se hace muy difícil, sobre todo en amplios periodos de tiempo, por el poco control que se tiene de las variables anteriormente mencionadas (Pulz, 2001). Los cultivos abiertos, ya sean en interiores o exteriores, son más propensos a contaminación que los cultivos cerrados (Molina- Grima, 2008). El cultivo de microalgas también puede ser continuo, semicontinuo o por lotes, siendo el último el más común debido a su simplicidad y a las ventajas que ofrece en cuanto a costos y operación (Pulz, 2001).

Condiciones tales como las características biológicas de la microalga, el objetivo de la producción de biomasa, la energía, la eficiencia en la utilización de la luz, el suministro de nutrientes, el control de la temperatura, el estrés hidrodinámico y el control de la contaminación con el fin de mantener el cultivo microalgal, entre otros, son aspectos fundamentales a la hora de elegir el método de cultivo (Molina- Grima, 2008)

5.4.1. Tipos de reactores

Se han utilizado una gran diversidad de reactores para el cultivo de microalgas. A pequeña escala, los reactores presentan formas tubulares, cilíndricas y esféricas con volúmenes desde 50 ml hasta 5 L, fabricados principalmente en vidrio.

A gran escala, los materiales varían desde metacrilato hasta polímeros especialmente diseñados para cada caso específico siendo la principal característica el permitir el paso de la luz hacia el reactor tanto en los casos situados al aire libre como en aquellos que utilizan fuente de luz artificial.

5.4.1.1. Sistemas abiertos

La facilidad de producción de microalgas es un factor importante a ser considerado para la producción óptima de una especie microalgal específica.

Por lo tanto, es importante analizar las diversas tecnologías existentes a la hora de maximizar la producción de un metabolito a partir del cultivo de microalgas con un bajo costo (Harun *et al.* 2010). Aunque el uso de los sistemas de cultivo abiertos es bastante común, estos presentan una serie de inconvenientes tales como la intensidad de la luz, temperatura, pH y la concentración de oxígeno disuelto, además de problemas con contaminantes y predadores que pueden limitar el

sistema de cultivo. A su favor está el aspecto económico ya que tienen un costo inicial bajo.

5.4.1.2. Fotobiorreactores

Basicamente, los fotobiorreactores se basan en diseños: tubulares y planos. La gran superficie de iluminación del reactor, la cual debe ser de un material translucido, es el principal factor a tener en cuenta (Harun *et al.* 2010)

Un fotobiorreactor está diseñado de tal manera que no permite la incidencia directa de la luz sobre el cultivo, sin embargo permite el paso de ésta a través de las paredes transparentes del reactor. Tampoco permite el intercambio directo de gases con la atmósfera, esto permite una mayor protección del cultivo frente a la contaminación, los fotobiorreactores pueden ser interiores o exteriores, en donde la fuente de luz es artificial o solar, respectivamente (Molina- Grima, 2008)

Los fotobiorreactores se caracterizan por controlar parámetros como pH, temperatura, concentración de O₂ y CO₂ en valores conocidos; además reducen la evaporación de agua y la pérdida de CO₂ ocasionada por la desgasificación, permitiendo valores más altos en la concentración celular. Sin embargo, estos sistemas son más costosos de construir y operar que los estanques, debido a que requiere refrigeración y estricto control, por lo tanto, el uso de los fotobiorreactores está limitado a componentes de alto valor que no pueden ser obtenidos en el cultivo en estanques (Molina- Grima, 2008)

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Mantenimiento de microalgas

Fueron utilizadas las cepas de microalgas provenientes de American Type Culture Collection: *Scenedesmus Obliquus* ATCC 457, *Scenedesmus armatus* ATCC 429, *Scenedesmus sp.* ATCC 464, *Chlorella kesslerii* ATCC 468, *Chlorella sp.* ATCC 853, *Chlamydomonas moewusii* ATCC 588 y de la Universidad de Texas: *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 y *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505. Las cepas fueron mantenidas en medio Peptona Proteasa (Anexo I) esterilizado en autoclave a 121 °C durante 40 minutos. Las condiciones de cultivo incluyeron una temperatura de 25 ± 2 °C, e iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm, fotoperiodo luz:oscuridad (12:12).

El cultivo para mantenimiento se realizó en cajas de petri con capacidad de 35 mL, empleando un volumen de medio de 25 mL y realizando resiembra cada 5 semanas.

6.2. Condiciones de cultivo en ensayos de crecimiento

6.2.1. Ensayos de crecimiento con aire

El cultivo de las diferentes microalgas se realiza por triplicado en erlenmeyer de 500 mL y medio de cultivo Bold Basal Medium (BBM) (Anexo I). Las condiciones de crecimiento fueron: volumen de medio de cultivo 300 mL, concentración celular inicial: 0.02 (g/L) para las microalgas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, ATCC 588, UTEX 1230, UTEX 90 y 0.01 (g/L) para la microalga

UTEX 2505; Temperatura 25 ± 2 °C; iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm, fotoperiodo luz : oscuridad (12:12). y aireación a 1 vvm con aire atmosférico donde el CO₂ se estima en 380 ppm (Minillo *et al*, 2013). El tiempo de cultivo fue de 30 días para todas las cepas trabajadas.

6.2.2. Ensayos de crecimiento con Aire + CO₂

La cinética de crecimiento con aire enriquecido con CO₂ se realizó por triplicado en erlenmeyer de 500 mL y medio de cultivo Bold Basal Medium (BBM) o solución Bristol estándar (Anexo I). Las condiciones de crecimiento fueron: volumen de medio de cultivo 300 mL, concentración celular inicial: 0.02 (g/L) para las microalgas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, ATCC 588, UTEX 1230, UTEX 90 y 0.01 (g/L) para la microalga UTEX 2505; Temperatura 25 ± 2 °C; Las condiciones de cultivo incluyeron una temperatura de 25 ± 2 °C, iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm, fotoperiodo luz:oscuridad (12:12), aireación de 1 vvm con aire enriquecido con CO₂, a una concentración estimada del 2% en el flujo de entrada. El tiempo de cultivo fue de 30 días para todas las cepas trabajadas.

6.2.3. Estudio del efecto de la variación de la concentración de los nutrientes NaNO₃ (Nitrato) y K₂HPO₄ (Fosfato) sobre el medio de cultivo de 4 cepas de microalgas candidatas para captura de CO₂

En el cultivo de las 4 especies de microalgas seleccionadas se utilizaron erlenmeyer de 500 mL y el medio de cultivo modificado. Las condiciones de crecimiento fueron: volumen de medio de cultivo 300 mL, concentración celular inicial: 0.1 (g/L) para el conjunto de microalgas; Temperatura 25 ± 2 °C; iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm con fotoperiodo luz:

oscuridad (12:12) y aireación a 2 vvm con aire enriquecido con CO₂, a una concentración estimada del 2% en el flujo de entrada. El tiempo de cultivo fue de 30 días para todas las cepas trabajadas.

6.3. Cuantificación de Biomasa

La biomasa generada para las cepas ATCC 457, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853 y UTEX 1230 se determinó por medio de lecturas de absorbancia a longitudes de onda de 683, 684, 683, 683 y 684.5 nm respectivamente. La biomasa generada en los cultivos de las cepas ATCC 429, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505 se cuantificó por el método de peso seco, utilizando una balanza de humedad Sartorius Mark 3 y sistema de filtración Sartorius stedim 1824 con membranas de celulosa de 0.45 µm y 47 mm de diámetro. Estas variantes en los métodos utilizados para cuantificar la biomasa, sólo se involucran en los ensayos de crecimiento con aire. Para los demás ensayos, la biomasa producida en los sistemas siempre se cuantificó por el método de peso seco.

6.4. Parámetros cinéticos de crecimiento de las microalgas

- Velocidad específica de crecimiento (μ en d⁻¹), se calcula según la siguiente

expresión (Andersen, 2005):

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento (μ en d⁻¹)

$$\mu = \frac{\ln(N_i) - \ln(N_{i-1})}{t_i - t_{i-1}}$$

donde, N_i es la Concentración Celular en g/L, en el tiempo t_i , en horas o días, según se especifique.

Tiempo de duplicación: (t_d , días). Es el tiempo necesario para la división de una célula. Se calcula a partir de la velocidad específica de crecimiento para el instante i , μ_i , según (Andersen, 2005):

Ecuación 2 Tiempo de duplicación: (t_d , días)

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_i}$$

6.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los ensayos de crecimiento con Aire y los ensayos de crecimiento con Aire + CO₂, se realizan empleando el software STATGRAPHICS PLUS 5.1®. Se efectúan análisis de varianza (ANOVA) con una confianza del 95%, se establecen las diferencias en cuanto a producción de biomasa (g/L) y productividad (g/L.d) entre las microalgas estudiadas mediante prueba de Tukey con una significancia del 5%. Las barras de error presentadas en las Gráficas corresponden a la desviación estándar.

De igual forma, se utilizó el software STATGRAPHICS PLUS 5.1® en el estudio del efecto de la variación de la concentración de los nutrientes NaNO₃ (Nitrato) y K₂HPO₄ (Fosfato) sobre el medio de cultivo. En el análisis se determinan los intervalos de confianza para los valores óptimos teóricos de producción de biomasa y productividad.

6.6. Diseño experimental

Para el estudio del efecto de la variación de la concentración de los nutrientes NaNO_3 y K_2HPO_4 sobre el medio de cultivo con las microalgas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505 se planteó un diseño experimental de fase centrada $2^2 +$ estrella y 2 repeticiones, con dos factores en tres niveles cada uno como se muestra en la tabla 1. Las concentraciones de los compuestos NaNO_3 (Nitrato) y el K_2HPO_4 (Fosfato), se establecen como los dos factores experimentales en el estudio.

Tabla 1. Factores y sus niveles de diseño experimental para la evaluación en la producción de biomasa y productividad

?

Nivel			
Factor	1	0	-1
NaNO_3 (g/L)	1.5	0.85	0.25
K_2HPO_4 (g/L)	0.2	0.14	0.08

Se tienen 20 unidades experimentales como se detalla en la tabla 2. La evaluación se hace para puntos bajos, medios y altos de concentración de los factores y se tiene como blanco el medio de cultivo sin modificaciones

?

?

???

?

Tabla 2. Distribución tratamientos en el diseño experimental

?

Tratamiento	Factores		Réplicas
	NaNO ₃ (Nitrato)	K ₂ HPO ₄ (Fosfato)	
1	1	1	2
2	0	1	2
3	-1	1	2
4	1	0	2
5	0	0	4
6	-1	0	2
7	1	-1	2
8	0	-1	2
9	-1	-1	2

???

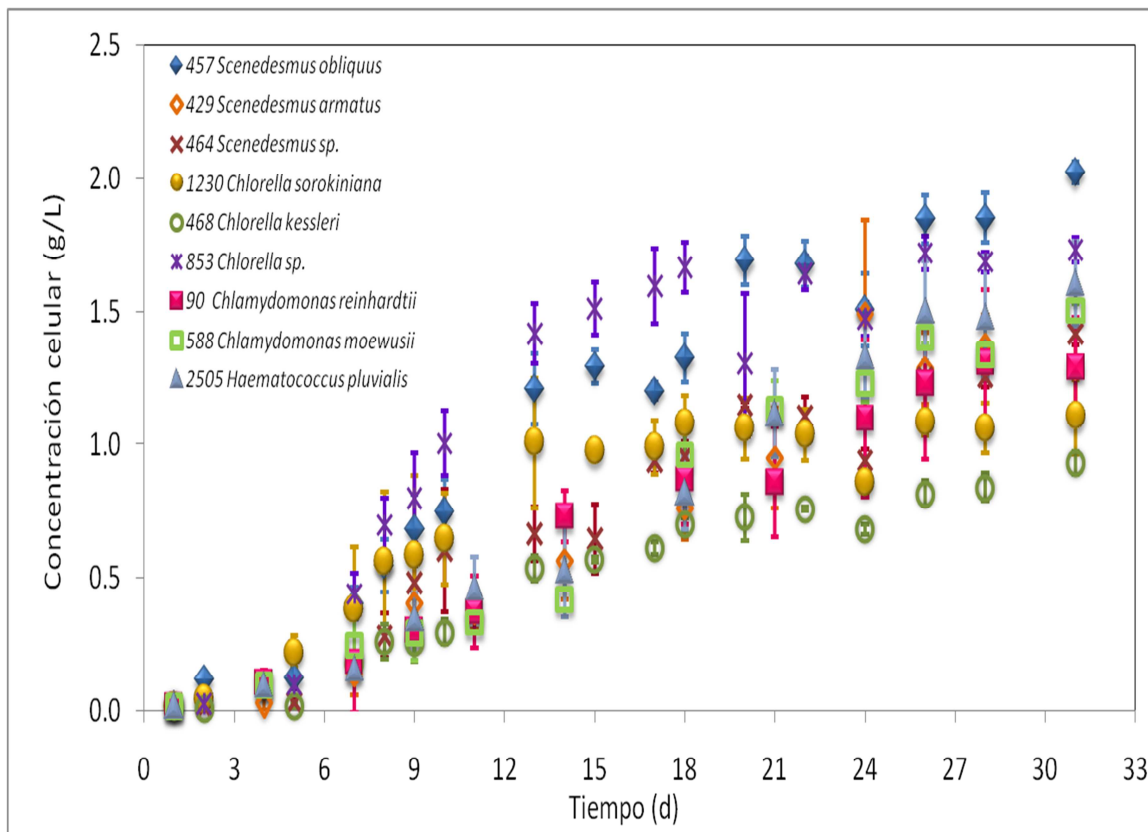
?

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Ensayos de crecimiento con Aire

El ensayo de crecimiento para las microalgas inyectando solo aire atmosférico al sistema, permitió determinar características de crecimiento propias de cada cepa de trabajo, evaluar y mejorar aspectos técnicos en el sistema de cultivo, con el fin de ponerlo a punto para posteriores ensayos. Al ser un ejercicio preliminar, los resultados obtenidos no se analizan de manera determinante en cuanto a la producción de biomasa y la productividad mostrada por cada una de las cepas.

La Gráfica 3 presenta los perfiles de crecimiento para cada una de las cepas evaluadas. Se puede determinar el inicio de la fase de crecimiento exponencial a partir del quinto día del ensayo, esto se generaliza para el conjunto de microalgas estudiadas. La cepa ATCC 457 (*S. obliquus*) alcanzó la mayor producción de biomasa con un valor de 2,02 (g/L).



Gráfica 3. Perfiles de crecimiento de las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, UTEX 1230, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505. Medio BBM, Temperatura 25 ± 2 °C; iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm con fotoperiodo luz: oscuridad (12:12) y aireación a 1 vvm con aire atmosférico (CO_2 estimado en 380 ppm).

Los parámetros cinéticos mostrados en la tabla 3 evidencian que la cepa UTEX 2505 tiene la mayor velocidad de crecimiento 0.17 d^{-1} y el menor tiempo de duplicación de su biomasa con 4.10 d. Estos son parámetros estrechamente relacionados con la productividad del sistema.

Tabla 3. *Parámetros cinéticos de crecimiento del conjunto de cepas estudiadas*

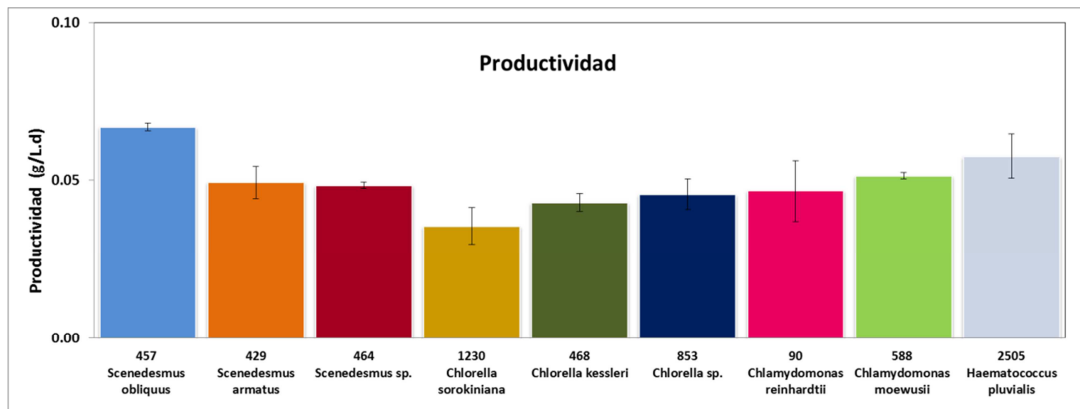
?

Cepa	μ (d ⁻¹)	λ (d)
ATCC 457	0.15	4.50
ATCC 429	0.14	5.00
ATCC 464	0.14	4.88
UTEX 1230	0.13	5.19
ATCC 468	0.14	4.95
ATCC 853	0.15	4.66
UTEX 90	0.14	4.99
ATCC 588	0.14	4.81
UTEX 2505	0.17	4.10

Los resultados de productividad (Gráfica. 4) muestran que aquellas cepas que tuvieron mayores tiempos de estabilización, alcanzaron los valores más altos en cuanto a productividad. Con un valor de productividad de 0.066 (g/L.d), la cepa ATCC 457 presenta el mayor comportamiento dentro del grupo de estudio. No muy alejado de este valor se encuentra la cepa UTEX 2505 que reportó 0.056 (g/L.d). Aunque son valores cercanos, la diferencia frente a este aspecto radica en el día de estabilización en el cultivo. Mientras la cepa UTEX 2505 se estabilizó el día 26 del ensayo, la cepa ATCC 457 no mostró una tendencia a la estabilización dentro de la curva de crecimiento, por lo tanto su productividad fue calculada el día 31, es decir, en el momento en que se concluyó el estudio.

???

?



Gráfica 4. Productividad obtenida para las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, UTEX 1230, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505 a las mismas condiciones de cultivo referenciadas en la Gráfica 3.

Los resultados de los ensayos de crecimiento con aire se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre los parámetros de cada especie se determinaron por el test de Tukey, a un nivel de significancia del 95% ($p=0,05$) (tabla 4), donde solo se halla diferencia significativa para la cepa ATCC 457 respecto de las cepas UTEX 1230, ATCC 429, UTEX 90 y ATCC 468, en cuanto a Concentración Celular se refiere tabla 5 (a). En el caso de Productividad no hay diferencia entre el grupo de estudio (Tabla 4 (b)).

Tabla 4. Prueba de múltiples rangos para concentración celular (a) y productividad por cepa (b). Método: 95.0 porcentaje Tukey

(a) Concentración celular (g/L)

Cepa	Grupos Homogéneos
1230	A
429	A
90	A
468	A
853	AB
464	AB
588	AB
2505	AB
457	B

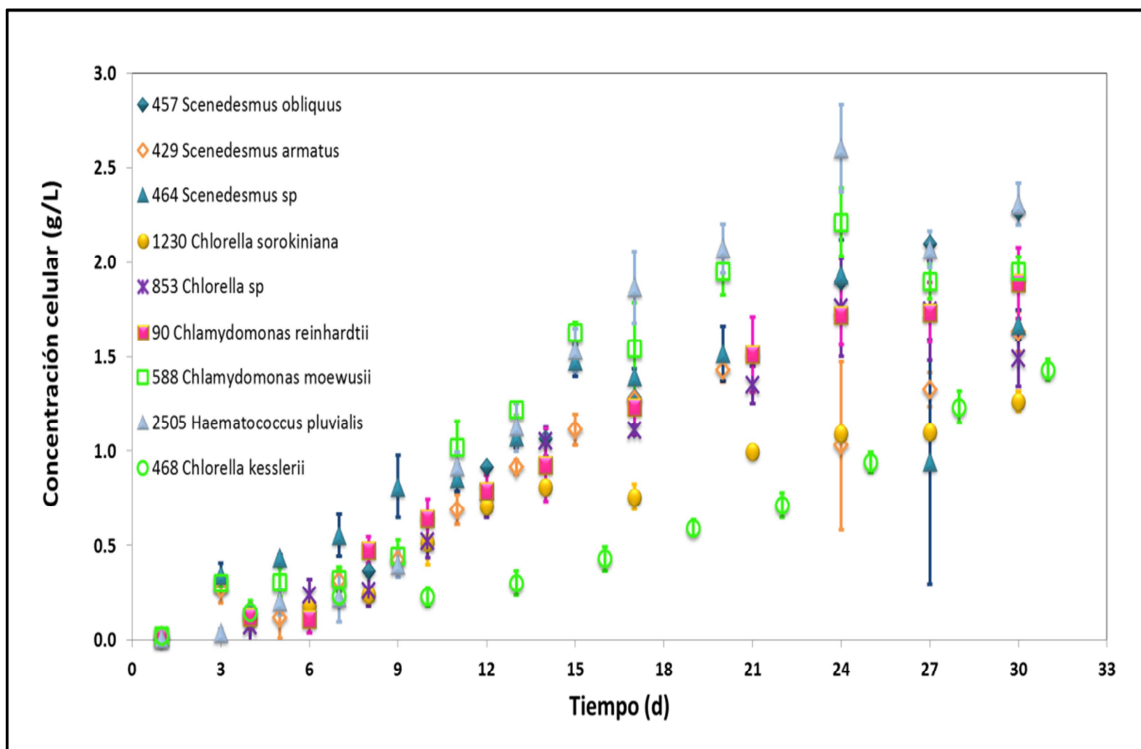
(b) Productividad (g/L.d)

Cepa	Grupos Homogéneos
1230	A
468	A
853	A
90	A
464	A
429	A
588	A
457	A
2505	A

En cuanto a características de crecimiento, todos los cultivos evidenciaron el color verde propio del cultivo de estas especies de microalgas, no se detectó la presencia de otras partículas dentro del cultivo. En cuanto a la adherencia a las paredes de los recipientes, las cepas UTEX 1230 y ATCC 853 mostraron las adherencias más fuertes a las paredes de los recipientes del ensayo. Las demás especies trabajadas no presentaron mayores complicaciones a la hora de homogeneizar el medio.

7.2. Ensayos de crecimiento con Aire + CO₂

Después de los ensayos preliminares, se realizaron cinéticas de crecimiento para el mismo conjunto de cepas, con el fin de determinar su respuesta a la inyección adicional de CO₂ en la corriente de aire de alimentación (Gráfica 5). Los resultados en cuanto a concentración celular y productividad, se analizaron como uno de los parámetros determinantes en la escogencia de cuatro cepas promisorias para captura de CO₂ y para nuevos ensayos con modificaciones al medio de cultivo. Para este caso, se inyecta CO₂ (2%) en la corriente de alimentación al sistema, los demás parámetros del ensayo son iguales a los descritos anteriormente.



Gráfica 5. *Perfiles de crecimiento de las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, ATCC 853, UTEX 1230, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505. Medio BBM, Temperatura 25 ± 2 °C; iluminación artificial de 32 WATT en un rango de 250-700 nm con fotoperiodo luz: oscuridad (12:12) y aireación a 1 vvm con 2% de CO₂ en la corriente de alimentación.*

Las cinéticas de crecimiento muestran el inicio de la fase exponencial alrededor del quinto día del cultivo, para el conjunto de cepas evaluadas. Los valores más altos de concentración celular fueron alcanzados por la cepa ATCC 457 y UTEX 2505 con valores de 2.26 (g/L) y 2.30 (g/L), respectivamente.

Los parámetros cinéticos (tabla 5) muestran nuevamente a la cepa UTEX 2505 como la que alcanza la mayor velocidad de crecimiento con $0.18 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ y el menor tiempo de duplicación de su biomasa con 3.81 (d).

Tabla 5. *Parámetros cinéticos de crecimiento del conjunto de cepas estudiadas*

?

Cepa	μ (d ⁻¹)	t_d (d)
ATCC 457	0.16	4.40
ATCC 429	0.15	4.73
ATCC 464	0.15	4.70
UTEX 1230	0.14	5.02
ATCC 468	0.14	4.87
ATCC 853	0.14	4.82
UTEX 90	0.15	4.57
ATCC 588	0.15	4.54
UTEX 2505	0.18	3.81

7.3. Comparación entre ensayos Aire y Aire + CO₂

La diferencia observada entre la producción de biomasa y la productividad de los ensayos de crecimiento con Aire y los que involucraron la inyección de CO₂ en la corriente de alimentación, no refleja una diferencia significativa para la mayoría de cultivos donde si hay aumento en la concentración celular como es el caso de las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, UTEX 1230, ATCC 48, UTEX 90, ATCC 588 y UTEX 2505 (Gráfica 6). Caso contrario, ocurre para la cepa ATCC 853, en la que se alcanza una concentración celular de 1.49 (g/L), valor que está por debajo de los resultados en el ensayo solo con aire, con valores de producción de biomasa de 1.73 (g/L).

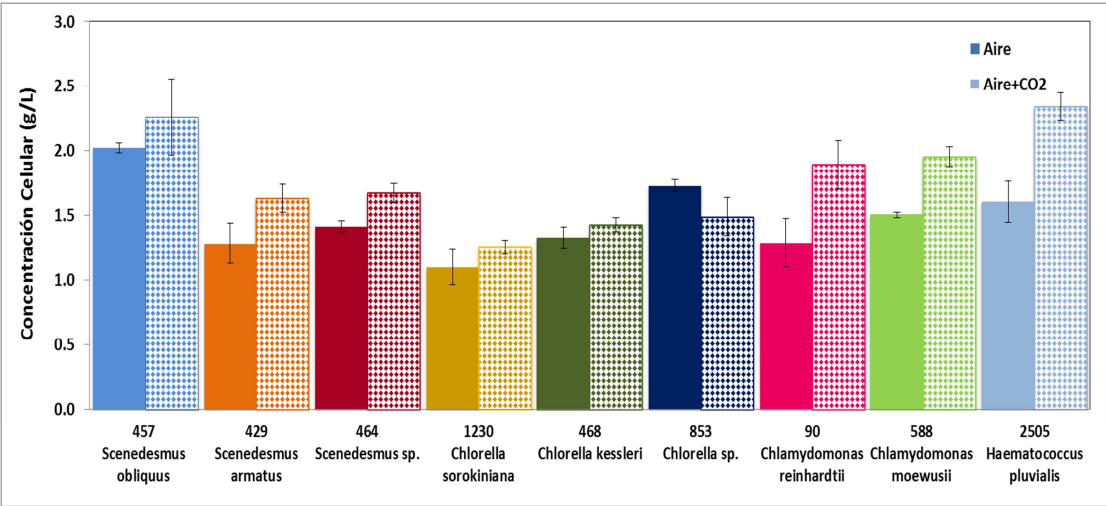
???

?

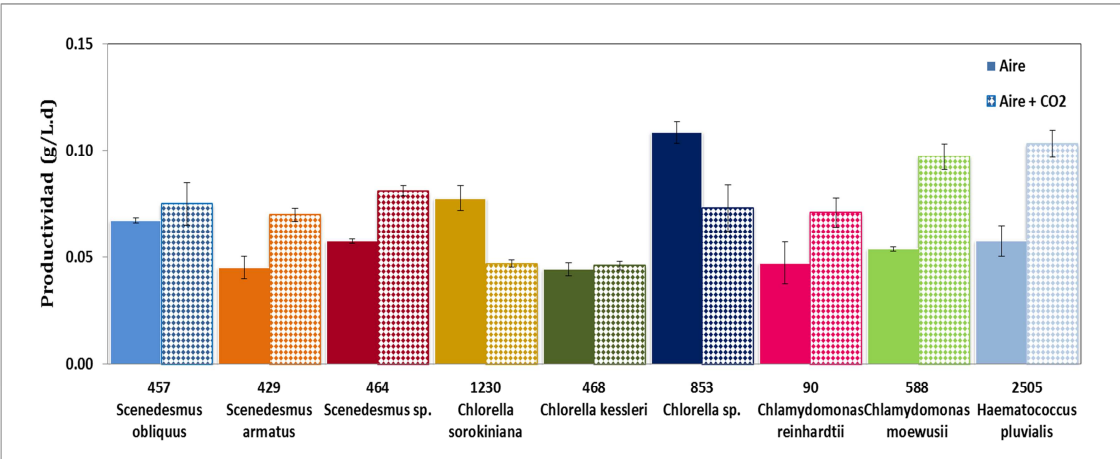
Gráfica 6. Comparación de Concentración celular (g/L) (a) y Productividad (b) en ensayos de Aire y Aire + CO₂

?

(a)



(b)



Para el caso de la Productividad (g/L.d), el aumento en los valores, se presenta para las cepas ATCC 457, ATCC 429, ATCC 464, ATCC 468, UTEX 90, ATCC

???

?

588 y UTEX 2505. Para las cepas UTEX 1230 y ATCC 853 no se reporta un aumento en la productividad en los ensayos con CO₂, por el contrario, hay una disminución de esta.

Los resultados del experimento se analizan mediante el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre los valores de Concentración celular (g/L) y Productividad (g/L.d) fueron determinadas por el test de Tukey, a un nivel de significancia del 95% (p=0,05). Para este análisis se utiliza el software *STATGRAPHICS PLUS 5.1®*, el cuál arroja los siguientes resultados resumidos en la Tabla 6, donde solo se halla diferencia estadística entre los resultados para la cepa UTEX 2505 y ATCC 588 en cuanto a concentración celular. Para Productividad, los valores que permiten evidenciar una diferencia significativa entre ellos se dan para las cepas ATCC 429, ATCC 464, ATCC 588 y UTEX 2505.

Tabla 6. Diferencias significativas entre ensayos de crecimiento con Aire y Aire + CO₂

Cepa	Grupos Homogéneos		Grupos Homogéneos	
	Concentración celular (g/L)		Productividad (g/L.d)	
	Aire	Aire + CO ₂	Aire	Aire + CO ₂
ATCC 457	A	A	A	A
ATCC 429	A	A	A	B
ATCC 464	A	A	A	B
ATCC 1230	A	A	A	A
ATCC 468	A	A	A	A
ATCC 853	A	A	A	A
UTEX 90	A	A	A	A
ATCC 588	A	B	A	B
UTEX 2505	A	B	A	B

Una razón para que no haya un aumento considerable en las variables de respuesta cuando se adiciona CO₂ en la corriente de alimentación puede estar fundamentada en la velocidad de dilución del CO₂ en el medio.

Teniendo en cuenta que el volumen de trabajo fue de 300 mL, es decir, una longitud de la columna de medio pequeña, se puede dar que el CO₂ que entra al sistema recorra rápidamente esa longitud y no permita un tiempo suficiente de residencia del gas en el medio que le permita solubilizarse, presentándose el escape de gran parte del CO₂ que ha sido alimentado.

Esta situación, puede solucionarse con una inyección menor de CO₂ cuando se habla de volúmenes de trabajo tan pequeños, permitiendo que la mayor parte del CO₂ ingresado al sistema sea consumido por las microalgas, minimizando la pérdida y aumentando el crecimiento celular.

7.3.1. Selección de microalgas para estudio de medios de cultivo

La cinética de crecimiento en la que se inyecta aire enriquecido con CO₂ al sistema, permitió concluir que tan determinante es la alimentación de este compuesto como fuente adicional de carbono, respecto a la producción de biomasa ya determinada en los ensayos en los que sólo se alimentó aire atmosférico, donde el porcentaje de CO₂ es realmente bajo. Además de permitir esta comparación, los valores de concentración celular obtenidos en este ensayo en particular, permitieron establecer, dentro de un conjunto de parámetros de selección, cuatro microalgas de las 9 cepas estudiadas.

Esta selección además de incluir aquellas que obtuvieron los valores más importantes de producción de biomasa y productividad (Tabla 7), toma en cuenta otros criterios como facilidad de separación, metabolitos potenciales y adherencia a pared.

Tabla 7. Cepas con mayor valor de Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)




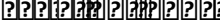

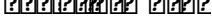



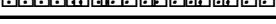

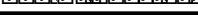

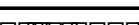



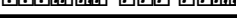



Cepa	Concentración celular (g/L)	Productividad (g/L.d)
ATCC 457	2.2 6	0.08
UTEX 90	1.89	0.07
ATCC 588	1.95	0.10
UTEX 2505	2.30	0.10

Teniendo en cuenta los demás criterios de selección ya mencionados, se utiliza una herramienta donde se establece un porcentaje de relevancia a cada parámetro, para posteriormente hacer una calificación de cada cepa evaluada según los ponderados establecidos. Los promedios establecidos para cada parámetro de selección se muestran en la Tabla 8 y son el resultado de los valores asignados por el equipo de trabajo del proyecto “SP1 Captura de CO₂ con microalgas” y tenidos en cuenta para fines de este trabajo.

Tabla 8. Parámetros de selección y valores promedio asignados.

Parámetro	Promedio
X _f (concentración final)	37.5%
Q (productividad)	32.1%
Facilidad de separación	12.1%
Metabolitos potenciales	8.6%
Adherencia a pared	9.8%

Teniendo en cuenta lo anterior, el resultado de la evaluación a cada especie de microalgas estudiadas se muestra en la Tabla 9 dado esto y valorando cada parámetro de selección las mejores cepas estudiadas en el orden de calificación son: UTEX 2505 *Haematococcus pluvialis*, ATCC 457 *Scenedesmus obliquus*, ATCC 588 *Chlamydomonas moewusii*, y UTEX 90 *Chlamydomonas reinhardtii*.

<p>  </p>	<p>  </p> <p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>
<p>  </p>	<p>  </p>

7.4. Estudio de medios de cultivo

El análisis de superficie de respuesta fue realizado para las cuatro cepas de microalgas seleccionadas: *ATCC 457*, *ATCC 588*, *UTEX 90* y *UTEX 2505*; cultivadas bajo las mismas características en cuanto a medios de cultivo y condiciones físicas dentro de los experimentos.

7.4.2. Resultados para cada cepa de estudio

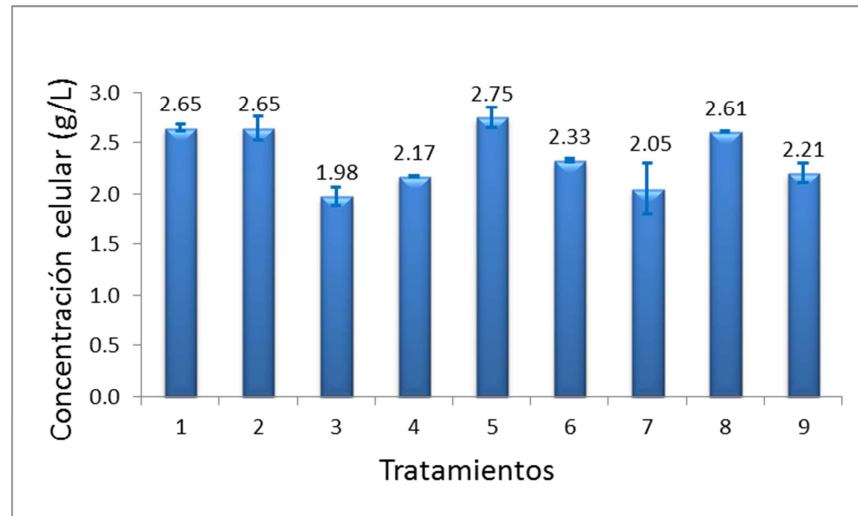
Para el análisis de los resultados, se analizan las variables de respuesta por separado y por último la optimización de múltiples respuestas, como paso previo a la validación experimental de los parámetros arrojados por el sistema. Para tal análisis se utiliza el software *STATGRAPHIS PLUS 5.1*[®]

7.4.2.1. Respuesta para la cepa *ATCC 457*

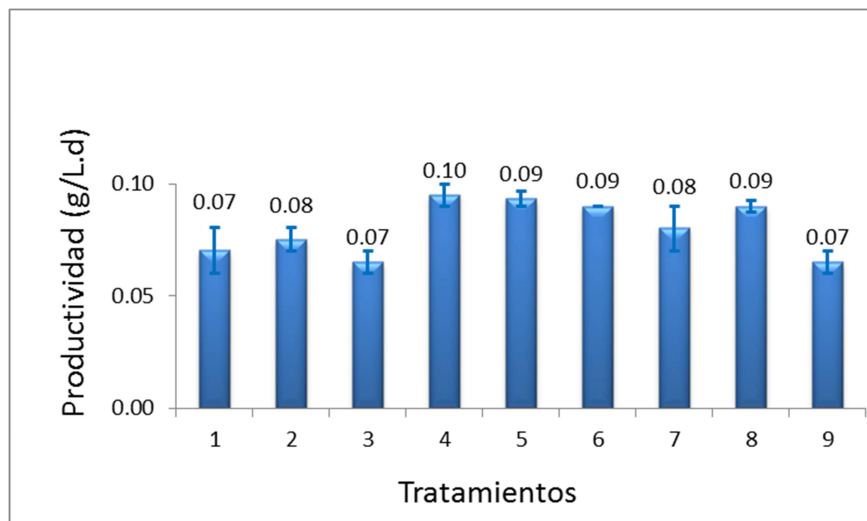
Concentración celular

La Gráfica 7 muestra los resultados para cada uno de los tratamientos evaluados en el ensayo, donde el valor más alto de concentración celular 2,75 (g/L) se alcanza en el tratamiento 5 (a), donde las condiciones de nitrato y fosfato están en los niveles medios del estudio, es decir 0.85 y 0.14 (g/L) respectivamente.

(a)



(b)



Gráfica 7. Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa ATCC 457

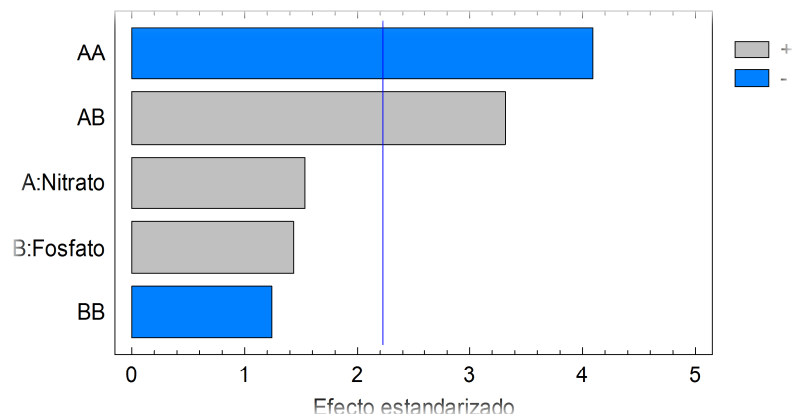
El análisis de varianza, mostrado en la Tabla 10, determina los coeficientes que son estadísticamente significativos ($p < 0,05$), es decir, influyen en el valor de la respuesta. Cuanto menor es el valor p , mayor es el efecto de ese término sobre la respuesta (Gutiérrez y de la Vara, 2004). En este sentido, se aprecia que los dos

factores que influyen en la concentración celular de la microalga ATCC 457 son el efecto cuadrático del Nitrato y la interacción ejercida por el Nitrato y el Fosfato en el medio de cultivo.

Tabla 10. *Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable Concentración celular (g/L) para la cepa ATCC 457*

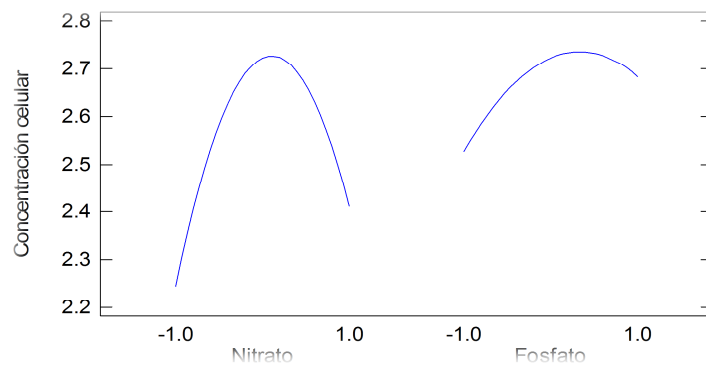
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Nitrato	0,0737694	1	0,0737694	2,35	0,1560
B:Fosfato	0,0650567	1	0,0650567	2,08	0,1803
AA	0,524814	1	0,524814	16,74	0,0022
AB	0,34445	1	0,34445	10,99	0,0078
BB	0,0484986	1	0,0484986	1,55	0,2419
bloques	0,0326537	1	0,0326537	1,04	0,3315
Error total	0,313488	10	0,0313488		
Total (corr.)	1,65242	16			

El diagrama de Pareto estandarizado, mostrado en la Gráfica 8 permite observar Gráficamente el análisis de varianza donde igualmente se determina que los factores más influyentes en la concentración celular son, el efecto cuadrático AA (Nitrato) y la interacción AB (Nitrato - Fosfato). Esto indica que un cambio en la interacción de ambos compuestos tendrá un efecto relevante en el crecimiento de la microalga, pero el factor determinante sobre la producción de biomasa será el efecto cuadrático de la concentración de NaNO_3 presente en el medio de cultivo.



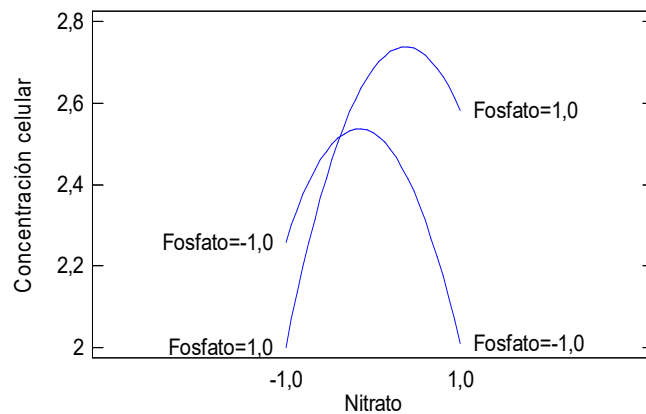
Gráfica 8. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración celular (g/L)

El efecto particular de cada una de las variables de entrada sobre la variable de respuesta puede observarse con mayor claridad en la Gráfica 9. Las representaciones de los efectos del Nitrato y el Fosfato en el medio presentan pendientes que explican la significancia del efecto de estas variables para el proceso y la sensibilidad de la variable de respuesta a estos factores, fenómeno que ya se observaba en el diagrama de Pareto estandarizado. El efecto de la concentración de Fosfato, presenta una línea con una pendiente menos pronunciada, por lo cual es una de las variables de menor relevancia para el proceso. La variable que presenta mayor pendiente es la concentración de Nitrato, esto indica que la concentración celular alcanzada en el sistema, presenta mayor sensibilidad a los cambios en los niveles de Nitrato. Sin embargo para ambos factores, se muestran valores similares de concentración celular en el punto de inflexión máximo.



Gráfica 9. *Efectos principales para concentración celular*

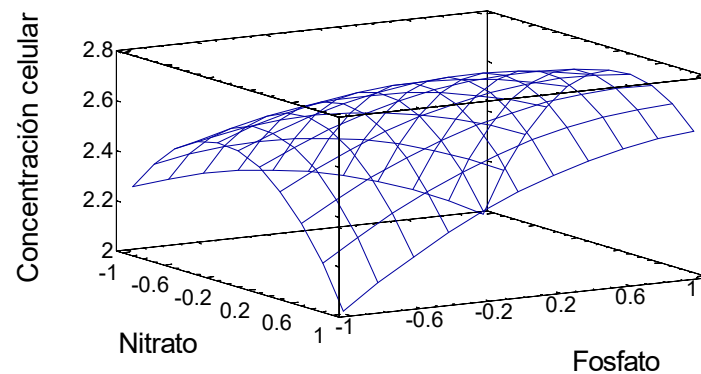
La gráfica de interacciones (Gráfica 10), muestra las condiciones más favorables para la producción celular en niveles de Fosfato altos y de Nitrato cercanos al valor intermedio o nivel medio. Allí también se muestra que las valores más bajos de concentración celular se encuentran cuando se mezclan los niveles, esto quiere decir condiciones de nitrato alto, con condiciones de fosfato bajo y viceversa.



Gráfica 10. *Interacciones de los efectos*

La Gráfica de superficie de respuesta (Gráfica 11) muestra que las condiciones máximas para concentración celular se encuentran por encima de los niveles intermedios de Nitrato y superiores de Fosfato, indicando además, como se había establecido anteriormente, que las condiciones más bajas de crecimiento celular

se presentan en niveles de tratamiento truncado, es decir, concentraciones de Nitrato altas con niveles de Fosfato bajos y viceversa.



Gráfica 11. *Superficie de respuesta estimada para concentración celular (g/L).*

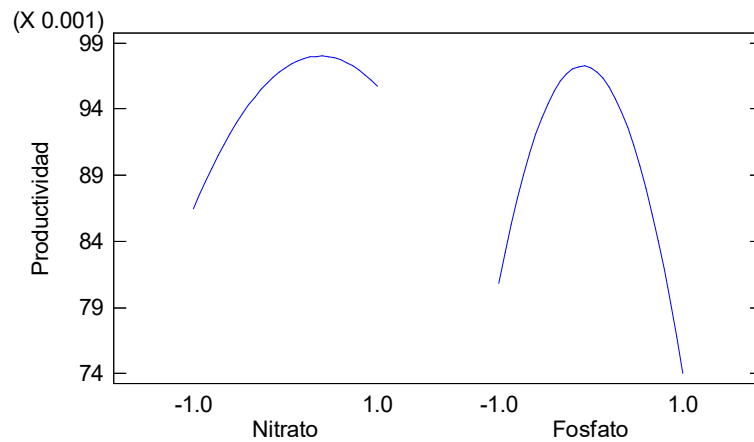
Productividad

El análisis de varianza para este caso (Tabla 12) detecta como único factor relevante sobre la productividad el efecto cuadrático de la concentración de fosfato, indicando esto que puede encontrarse un máximo o mínimo del proceso.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) para Productividad (g/L.d)

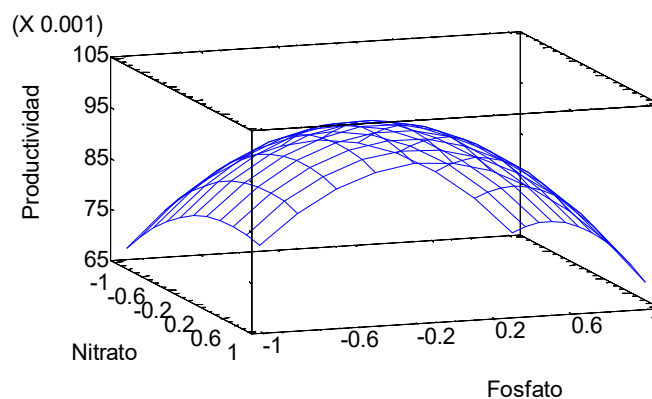
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Nitrato	0,000228893	1	0,000228893	3,74	0,0819
B:Fosfato	0,000124053	1	0,000124053	2,03	0,1850
AA	0,000124008	1	0,000124008	2,03	0,1850
AB	0,00005	1	0,00005	0,82	0,3873
BB	0,00138086	1	0,00138086	22,56	0,0008
bloques	2,77341E-7	1	2,77341E-7	0,00	0,9477
Error total	0,000611995	10	0,0000611995		
Total (corr.)	0,0028	16			

La Gráfica de efectos principales (gráfica 12) muestra que los cambios fuertes en la productividad del sistema se dan con las variaciones en la concentración del fosfato en el medio, indicando ésta un máximo de productividad en una región intermedia. De otro lado se observa, que aunque el comportamiento del nitrato en el medio tiene una dinamica no lineal, su variacion no influye significativamente sobre la Productividad. Sin embargo, se puede indicar que hay una respuesta máxima del sistema en niveles de concentración cercanos a valores superiores.



Gráfica 12. *Efectos principales para productividad*

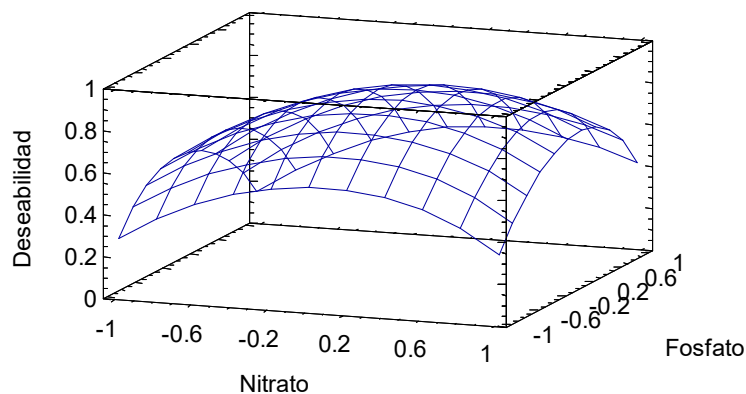
El sistema alcanza un punto óptimo global (Gráfica 13), donde la productividad sigue una dinámica en la que aumenta en la medida que se acerca a valores de la región central con respecto a la concentración de fosfato y un poco desviado de los niveles centrales hacia la derecha cercanos a 0.6 en cuanto a los niveles de nitrato. Caso contrario ocurre en niveles extremos de nitrato y fosfato, es decir, (-1,1), (-1,-1), (1,1), (1,-1) respectivamente, donde se hallan las productividades más bajas del sistema.



Gráfica 13. *Superficie de respuesta para Productividad (g/L.d)*

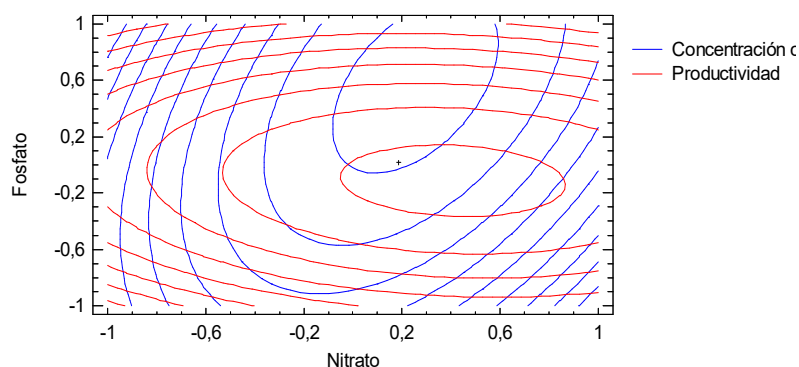
Optimización de múltiples respuestas

El modelo propone hacer una validación para alcanzar valores óptimos tanto en Concentración Celular como en Productividad (Gráfica 14), determinando niveles de trabajo para las concentraciones de las variables de entrada al sistema. El valor óptimo en cuanto a factores, se encuentra codificado en el rango de los valores bajos y altos trabajados en cada factor, por lo que se calcula el valor de concentración en el medio para ambos factores y se realiza dicha validación.



Gráfica 14. *Optimización de múltiples respuestas*

Las condiciones en las cuales se maximizan la concentración celular (g/L) y la productividad (g/L.d) se encuentran en la región central de los valores experimentales para el fosfato y niveles de concentración cercanos a 1 para el nitrato. Una gráfica de sobreposicionamiento (Gráfica 15) aclara dicha observación, encontrando la zona óptima donde se maximizan ambas respuestas en la región donde traslapan las dos elipses más pequeñas, correspondientes a la de concentración celular y productividad.



Gráfica 15. Sobreposicionamiento para la optimización de la Concentración celular (g/L) y la Productividad (g/L.d)

En esta zona se establecen las condiciones óptimas del proceso como se muestra en la tabla, que sugiere alcanzar una concentración celular de 2.72 (g/L) y una productividad de 0.09 (g/L.d).

Tabla 12. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)

Factor	Nivel óptimo (codificado)	Concentración en el medio (g/L)
Nitrato	0.185	0.99
Fosfato	0.016	0.14

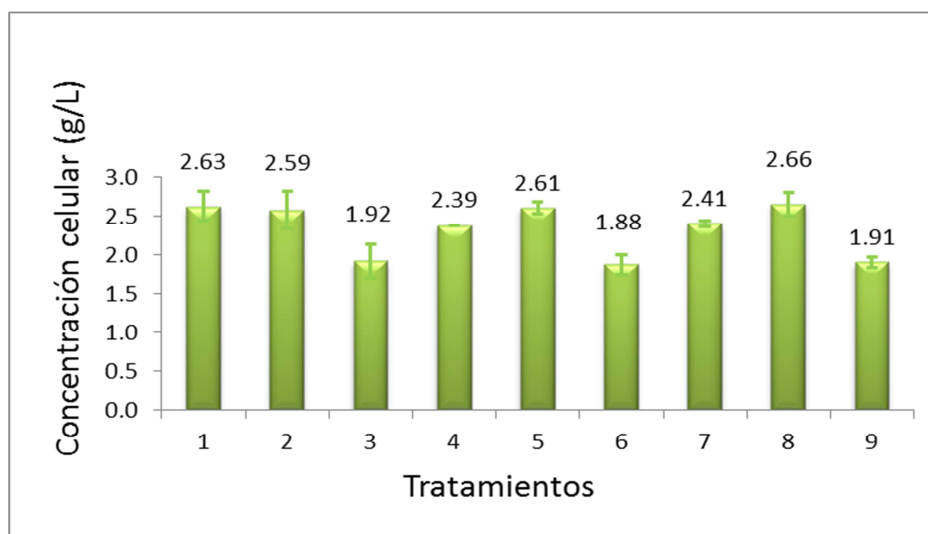
7.4.2.2. Respuesta de la cepa ATCC 588

Concentración celular

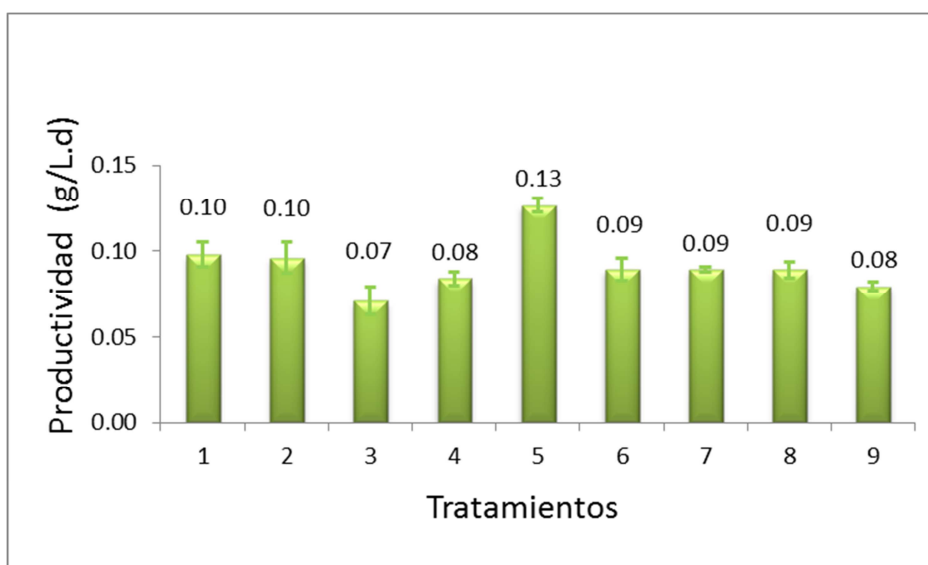
La Gráfica 16 presenta los resultados de concentración celular (g/L) (a) y productividad (g/L.d) (b) alcanzados en cada uno de los tratamientos evaluados.

Aunque era de esperarse que aquellos tratamientos donde se evaluaron concentraciones superiores de nitrato reportaran concentraciones superiores mayores, debido a que el nitrato en el medio es un factor altamente incidente en el crecimiento de las microalgas, los valores más altos de concentración celular fueron alcanzados en los tratamientos donde la concentración de nitrato en el medio estaba en un nivel intermedio, con valores de 2.66, 2.61 y 2.59 (g/L)

(a)



(b)



Gráfica 16. Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa ATCC 588

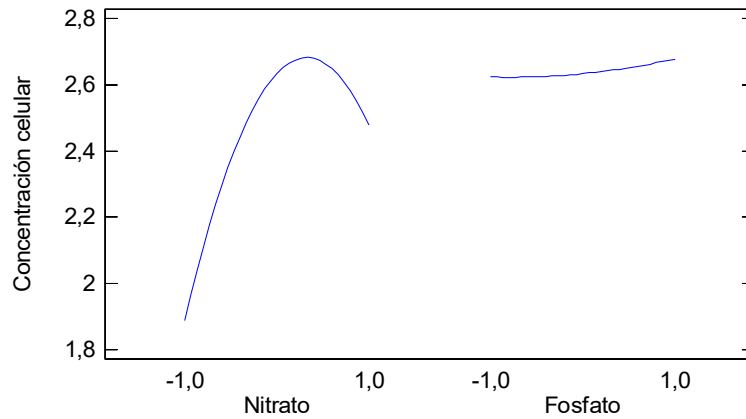
El análisis de varianza (Tabla 13) destaca el efecto significativo que ejercen los niveles de nitrato sobre la concentración celular alcanzada en el sistema. Según los resultados del ANOVA, los valores de concentración celular son muy sensibles

a cambios en las concentraciones de nitrato presentes, corroborado por la significancia del efecto cuadrático del nitrato. Esto lleva a pensar, que en el crecimiento de la cepa ATCC 588, el factor más condicionante es el nitrato, independiente de los niveles o concentraciones de fosfato con las que se trabaje.

Tabla 13. Análisis de Varianza (ANOVA) para la concentración celular

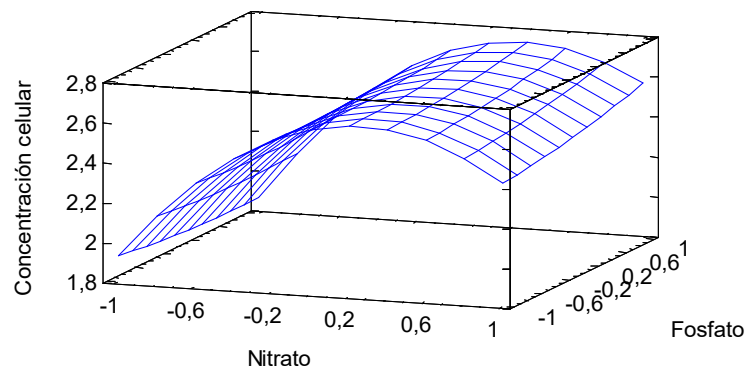
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Nitrato	0,930398	1	0,930398	22,68	0,0005
B:Fosfato	0,009075	1	0,009075	0,22	0,6465
AA	0,879001	1	0,879001	21,43	0,0006
AB	0,02205	1	0,02205	0,54	0,4775
BB	0,00124673	1	0,00124673	0,03	0,8645
Error total	0,492251	12	0,0410209		
Total (corr.)	2,51812	18			

En el Gráfica de efectos principales (Gráfica 17) se presenta con mayor claridad la dinámica que sigue la variable concentración celular. En la curva que describe el efecto del nitrato sobre la variable de respuesta, se presenta una inflexión que genera un máximo de concentración celular en la región media de los niveles de nitrato, alcanzando valores cercanos a 2,7 (g/L). En el caso de la concentración de fosfato, se puede observar que no influye significativamente sobre la concentración celular, mostrando que en cualquier condición de fosfato en la que se trabaje, la respuesta serán altos valores de concentración celular. Esta situación también se evidencia en el ANOVA, donde la interacción entre los factores de estudio no tiene significancia sobre la variable de respuesta.



Gráfica 17. *Efectos principales para concentración celular*

La superficie de respuesta (Gráfica 18) muestra una curvatura creciente en función del aumento en los niveles de nitrato, llevando a suponer que a mayor concentración de nitrato en el medio mayor concentración celular. Sin embargo, debido a que esta dinámica no es lineal, se presenta un punto de inflexión máximo cercano a la región de niveles medios de nitrato.



Gráfica 18. *Superficie de respuesta para concentración celular (g/L)*

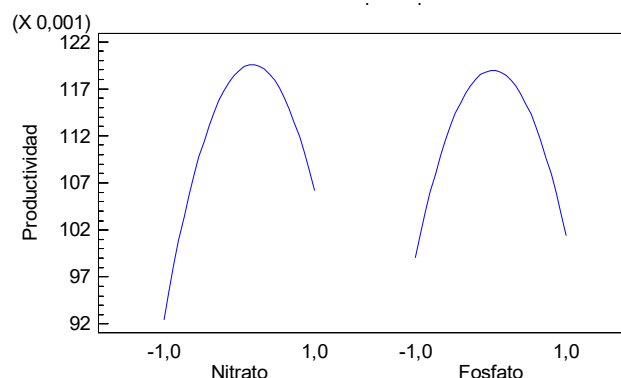
Productividad

Para el caso de la productividad del sistema, el análisis de varianza (Tabla 15) indica que los efectos que presentan significancia estadística sobre la productividad, son los efectos cuadráticos del nitrato y fosfato, más allá de la interacción entre ambos factores de estudio, la cual no es determinante en la variable de respuesta.

Tabla 14. *Análisis de varianza (Anova) para Productividad (g/L.d)*

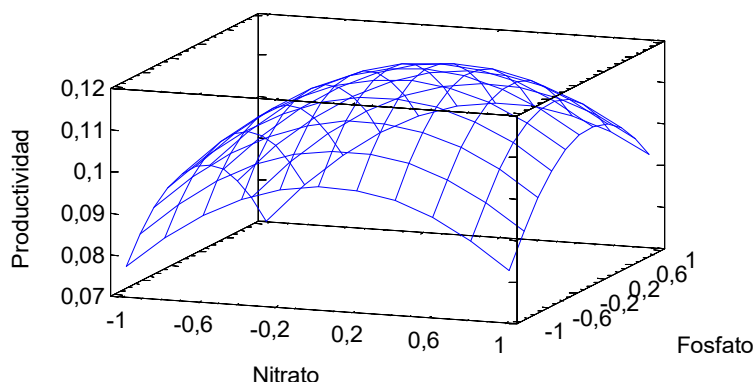
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Nitrato	0,000502803	1	0,000502803	2,92	0,1132
B:Fosfato	0,0000163333	1	0,0000163333	0,09	0,7634
AA	0,00167213	1	0,00167213	9,71	0,0089
AB	0,0001445	1	0,0001445	0,84	0,3777
BB	0,00143558	1	0,00143558	8,34	0,0136
Error total	0,00206613	12	0,000172178		
Total (corr.)	0,00680242	18			

En la Gráfica de efectos principales (Gráfica 19) se observa que tanto el nitrato como el fosfato, tienen una dinámica creciente hasta la región de los niveles intermedio. Es en esta región, donde hay una inflexión y se alcanza la máxima productividad, alrededor de 0,122 (g/L.d). Aparentemente, ambos factores analizados por separado presentan valores similares de productividad.



Gráfica 19. *Efectos principales para productividad*

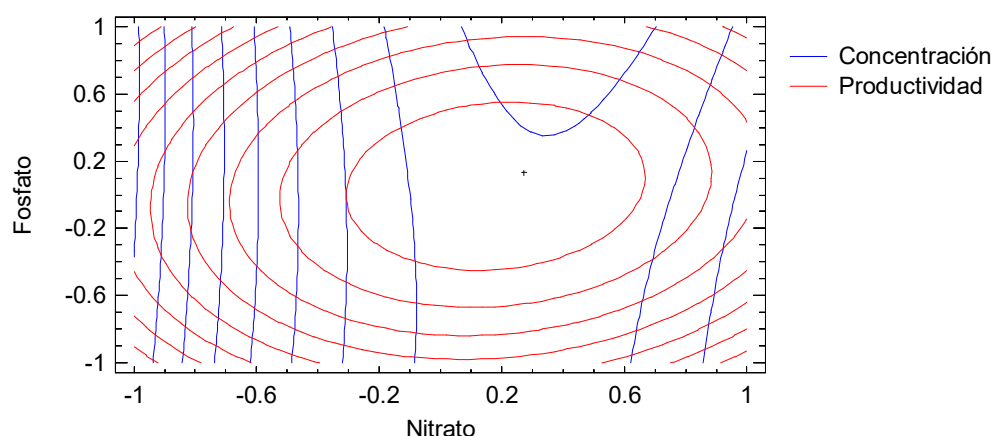
En el análisis de la superficie de respuesta, se presenta un problema con respecto al modelo de regresión establecido, cuyo valor de R^2 es muy bajo (inferior al 70%). Lo que indica que no hay un buen ajuste entre el modelo y los datos experimentales. A pesar de esta situación, se realiza el análisis de la superficie la cual muestra un máximo (gráfica 20) ligeramente superior a la región media tanto de los niveles de Nitrato como de fosfato.



Gráfica 20. *Superficie de respuesta para Productividad (g/L.d)*

Para la optimización de la Concentración Celular (g/L) y la Productividad (g/L.d), los niveles que propone la optimización de múltiples respuestas arroja los puntos óptimos para los factores en valores codificados. Esta superficie (gráfica 21) muestra mayor deseabilidad en valores de Nitrato en una región intermedia, pues

después de estos niveles empieza a generarse un descenso en la superficie, independiente de la tendencia o concentración de Fosfato presente en el proceso. Un análisis más detallado puede hacerse a partir de la Gráfica de contorno donde se observa que las mejores condiciones de los procesos se encuentran en niveles de nitrato medios y fosfato altos.



Gráfica 21. Contorno de la superficie de respuesta

En esta zona se establecen las condiciones óptimas del proceso como se muestra en la Tabla 16, para alcanzar una concentración celular de 2. 68 (g/L) y una productividad de 0.12 (g/L.d).

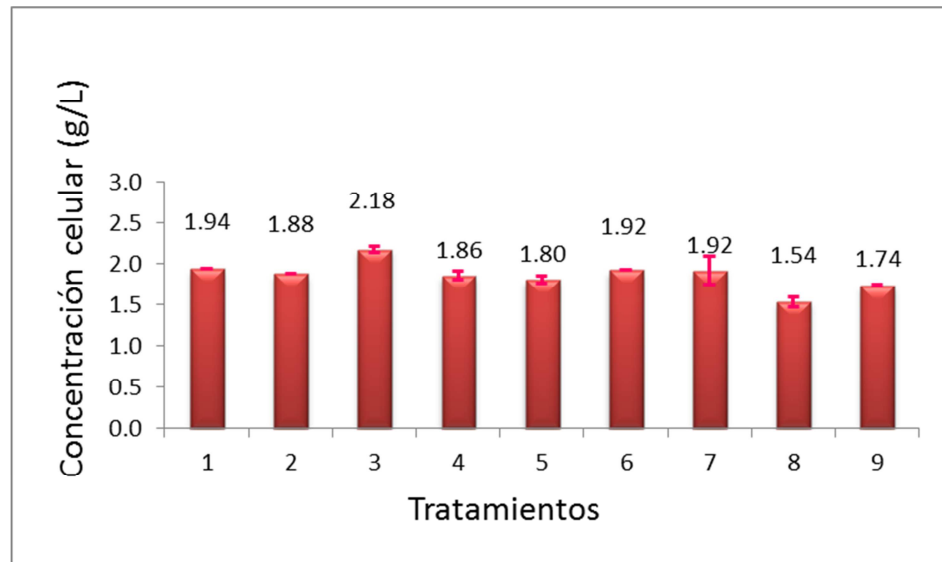
Tabla 15. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)

Factor	Nivel óptimo (codificado)	Concentración en el medio (g/L)
Nitrato	0.271	1.06
Fosfato	0.132	0.15

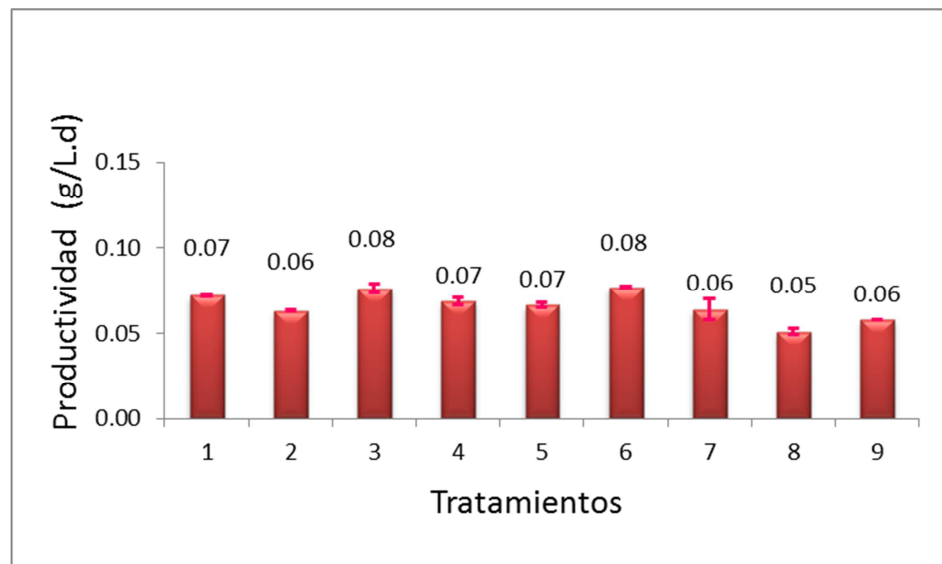
7.4.2.3. Respuesta de la cepa UTEX 90 en el ensayo de medios

La gráfica 22 muestra los valores alcanzados en cuanto a concentración celular (a) y productividad (b) para cada uno de los tratamientos evaluados, reportando que el tratamiento 3 alcanza la mayor respuesta del estudio tanto para concentración celular como para productividad, con valores de 2.18 (g/L) y 0.08 (g/L.d) respectivamente. El tratamiento 3 reporta la menor concentración de nitrato y la más alta de fosfato en el medio. La respuesta más baja se obtiene en el tratamiento, donde la concentración de nitrato está en la región media y la de fosfato en los niveles más bajos, con una respuesta de concentración celular de 1.54 (g/L) y productividad de 0.05 (g/L.d).

(a)



(b)



Gráfica 22. Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa UTEX 90

El análisis de varianza mostrado en la tabla 16 determina que el fosfato, el efecto cuadrático del nitrato (AA) y la interacción de los dos factores principales, tienen una influencia significativa sobre el crecimiento celular de la microalga. Sin embargo el hecho de que el efecto del nitrato no sea relevante y en vez de esto, su efecto cuadrático si, lleva a suponer que este factor tiene un punto máximo o mínimo sobre la concentración celular.

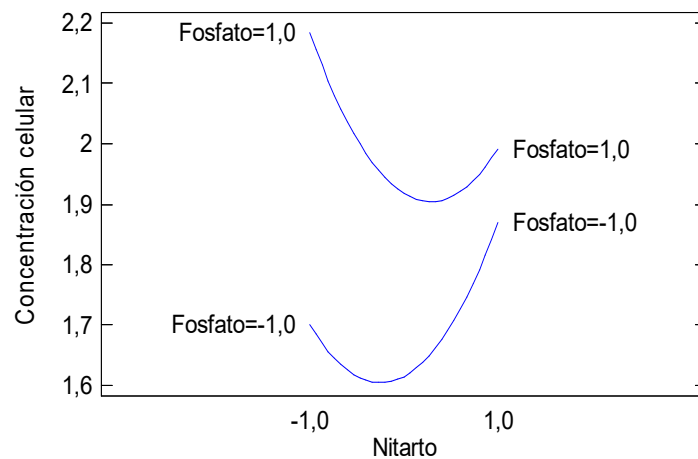
Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) para la concentración celular

2

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Nitrato	0,000310243	1	0,000310243	0,03	0,8606
B:Fosfato	0,195149	1	0,195149	20,55	0,0014
AA	0,103064	1	0,103064	10,86	0,0093
AB	0,0516363	1	0,0516363	5,44	0,0446
BB	0,00246314	1	0,00246314	0,26	0,6228
bloques	0,0388906	1	0,0388906	4,10	0,0737
Error total	0,0854468	9	0,00949409		
Total (corr.)	0,557775	15			

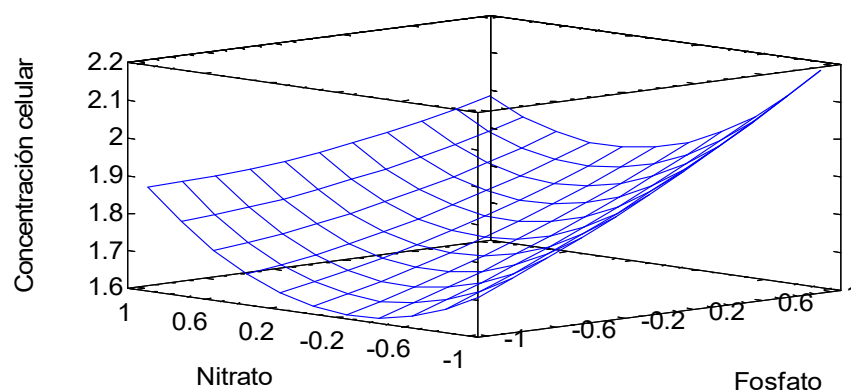
Los resultados de la interacción entre el fosfato y el nitrato (Gráfica 23), claramente muestra un comportamiento no lineal, donde la curva presenta una tendencia convexa con dos puntos mínimos para cada uno de los niveles de interacción. De aquí que los valores mínimos de concentración celular, se encuentran en las regiones intermedias de nitrato y de fosfato. Por otro lado, se observa que las mejores condiciones de concentración celular se favorecen en niveles bajos de nitrato y altos de fosfato. Sin embargo, aunque las condiciones contrarias a las descritas, es decir, niveles bajos de fosfato y puntos altos de

nitrito, presentan un aumento en la curva de crecimiento celular, no refleja valores superiores a los observados con niveles de fosfato altos, lo que corrobora el hecho de que la variable más relevante dentro del proceso, es la concentración de fosfato en el medio.



Gráfica 23. *Interacciones para los efectos Nitrato y Fosfato*

La determinación de las mejores condiciones de operación como lo muestra la superficie de respuesta (Gráfica 24), supone un punto óptimo para concentración celular en la región donde los valores experimentales se acercan a niveles altos de fosfato y bajos de nitrato.



Gráfica 24. *Superficie de respuesta para concentración celular (g/L)*

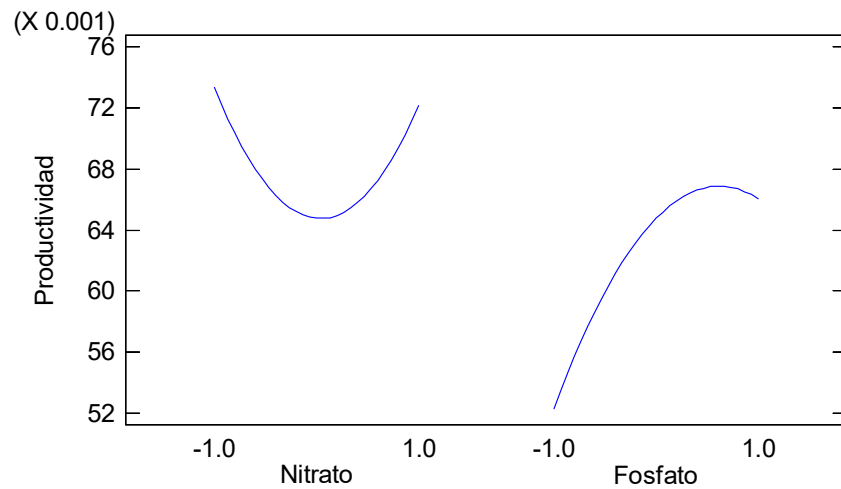
Productividad

El análisis de varianza para productividad del sistema (tabla 17) determina que el fosfato influye significativamente en la productividad del proceso. De la misma manera los hacen los efectos cuadráticos tanto del nitrato como del fosfato, con una tendencia cuadrática que supone puntos de inflexión, ya sean máximos o mínimos respecto a la productividad. Al no ser significativa el efecto de la interacción entre las variables principales, se concluye la independencia en la incidencia de cada uno en la productividad, es decir, su cambio individual afecta de manera no correlacionada la variable de respuesta.

Tabla 17. *Análisis de varianza (Anova) para Productividad (g/L.d)*

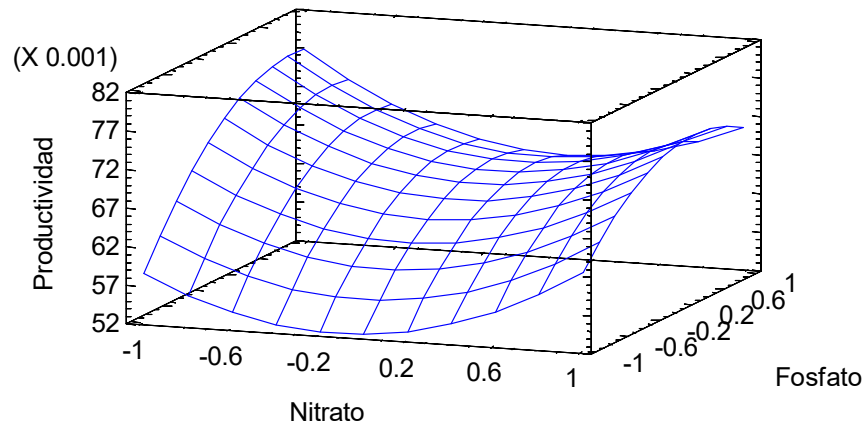
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Nitrato	0,0000031635	1	0,0000031635	0,20	0,6636
B:Fosfato	0,000397036	1	0,000397036	25,38	0,0007
AA	0,000225093	1	0,000225093	14,39	0,0043
AB	0,0000417564	1	0,0000417564	2,67	0,1368
BB	0,0000907529	1	0,0000907529	5,80	0,0394
bloques	0,0000335276	1	0,0000335276	2,14	0,1773
Error total	0,000140813	9	0,0000156459		
Total (corr.)	0,00110594	15			

El análisis individual del nitrato (Gráfica 25) muestra una curvatura, con un valor mínimo de productividad alrededor de 0.064 (g/L.d) en la región media del proceso. En cuanto al fosfato, cuando su concentración varía en la región superior, sigue una tendencia que muestra una curvatura convexa, presentado un punto máximo cercano a 0.068 (g/L.d)



Gráfica 25. *Efectos principales para productividad*

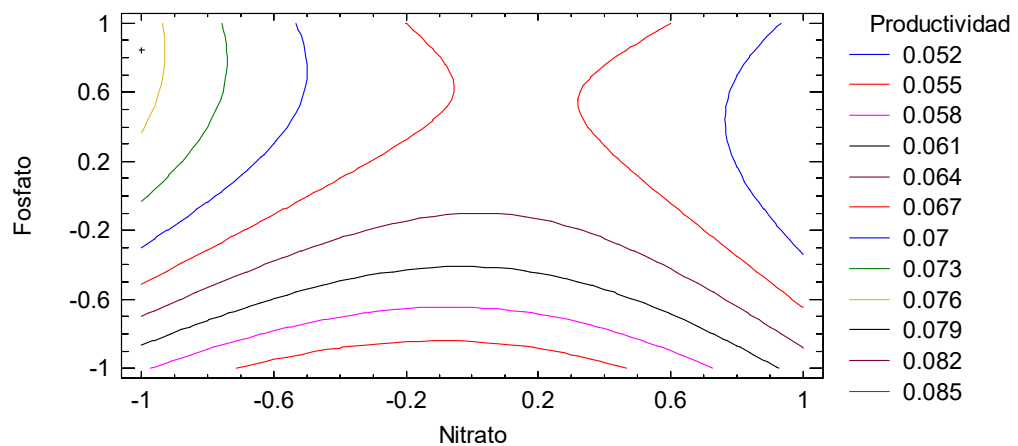
De acuerdo con los resultados mostrados en la superficie de respuesta (Gráfica 26), se observa un comportamiento de silla de montar, donde se genera un punto de inflexión en las condiciones ligeramente por encima del punto medio para el nitrato y cercano al nivel de 0.6 para el fosfato.



Gráfica 26. *Superficie de respuesta para productividad (g/L.d)*

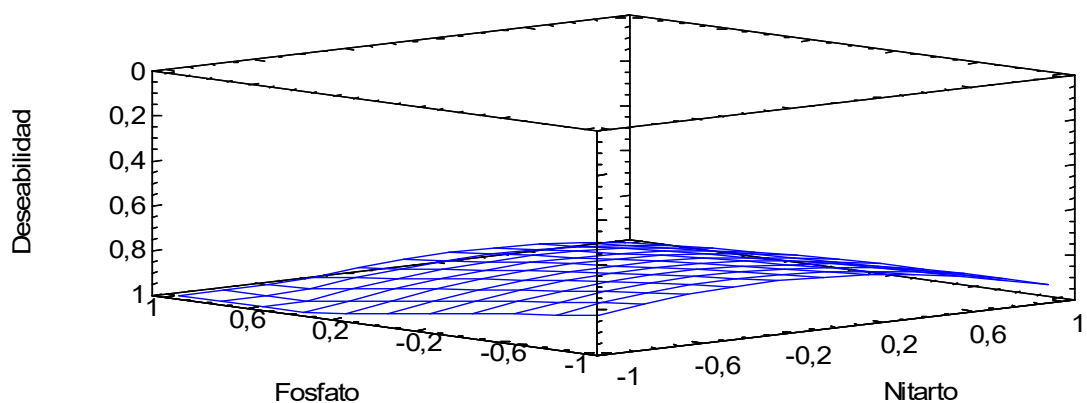
Además, las condiciones que conllevan a alcanzar más altas productividades se dan en niveles extremos de Nitrato, tanto positivos como negativos, encontrando

el valor más alto de productividad, como lo indica la curva de contorno (Gráfica 27), en los niveles de fosfato (1) y nitrato (-1).



Gráfica 27. Contornos de la superficie de respuesta para productividad

Para la optimización de la Concentración Celular (g/L) y la Productividad (g/L.d), los niveles que propone la optimización de múltiples respuestas arroja los puntos donde se halla la deseabilidad del proceso. Esta superficie (Gráfica 28) muestra el punto ideal para la optimización en condiciones de Nitrato -1 y fosfato +1, niveles que fueron evaluados en este estudio.



Gráfica 28. Superficie de respuesta para la optimización de múltiples respuestas

La Tabla 18 muestra las condiciones óptimas que maximizan la Deseabilidad, suponen concentraciones celulares de 2.18 (g/L) y productividades de 0.07 (g/L.d).

Tabla 18. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)

Factor	Nivel óptimo (codificado)	Concentración en el medio (g/L)
Nitrato	-0,1	0.25
Fosfato	0,823	0.2

Dado que los puntos de optimización de las respuestas corresponden a uno de los tratamientos evaluados en el estudio, conviene en este caso y para futuros ensayos, ampliar los niveles de la región experimental y así determinar si estas concentraciones propuestas, definitivamente corresponden a puntos donde se mejora la concentración celular y la productividad.

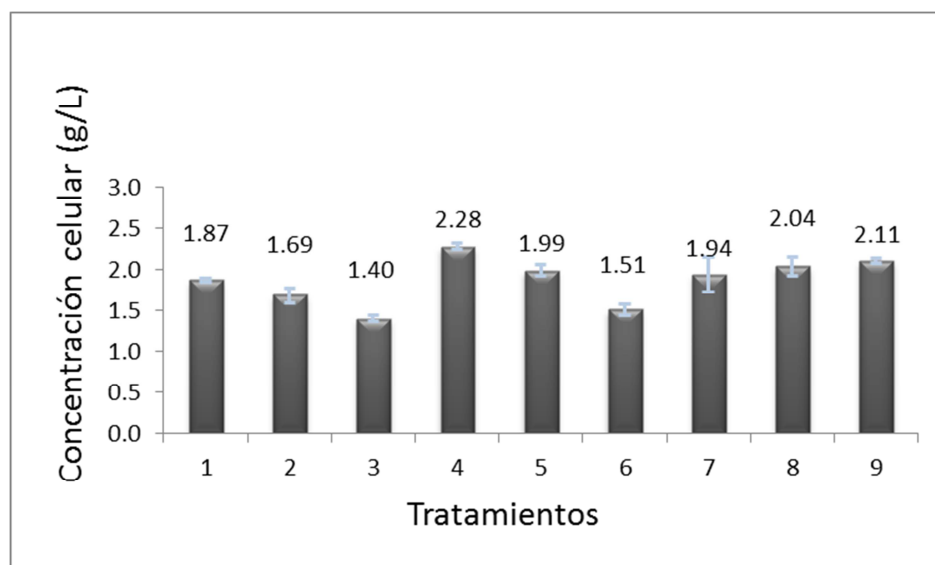
7.4.2.4. Respuesta de la UTEX 2505 en el ensayo de medios

Concentración celular

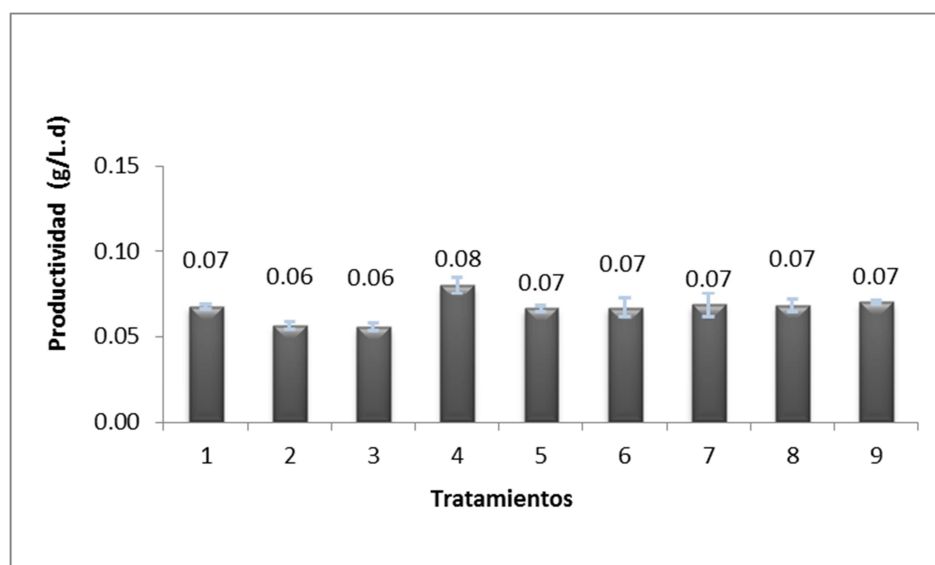
La gráfica 29 muestra los valores para concentración celular (g/L) (a) y productividad (g/L.d) (b) alcanzados en el estudio.

El tratamiento 4 con valores de 2.28 (g/L) para concentración celular y 0.08 (g/L.d) para productividad, presenta los valores más altos alcanzados en el ensayo.

(a)



(b)



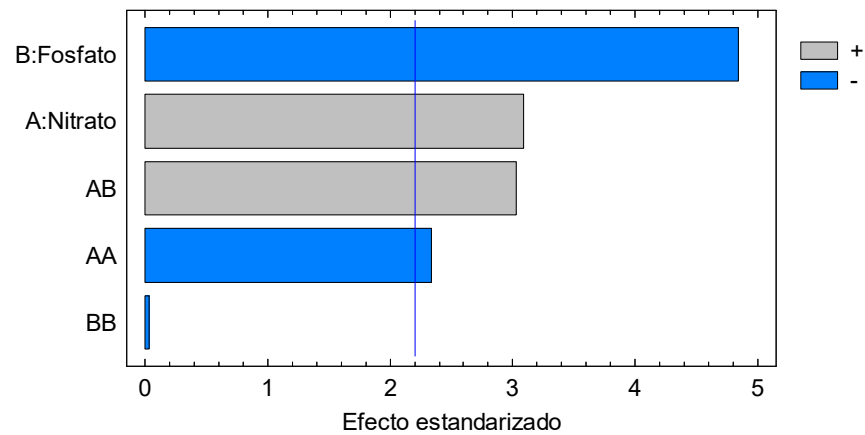
Gráfica 29. Resultados de concentración celular (g/L) (a) y Productividad (g/L.d) (b) en el ensayo de medios para los 9 tratamientos estudiados con la cepa UTEX 2505

El análisis de varianza mostrado en la tabla 20 determina que existen 5 factores relevantes dentro del proceso. La interacción entre los niveles de nitrato y los niveles de fosfato son un efecto significativo sobre la concentración celular generada en el sistema. Además el efecto cuadrático del nitrato también es relevante y presenta un comportamiento cuadrático. Todo lo anterior permite sugerir que la cepa UTEX 2505 (*H. pluvialis*) es sensible a las variaciones en los niveles de nitrato y fosfato con que se trabaje, además de las interacciones que pueda haber entre estos dos factores.

Tabla 19. *Análisis de Varianza (ANOVA) para la concentración celular*

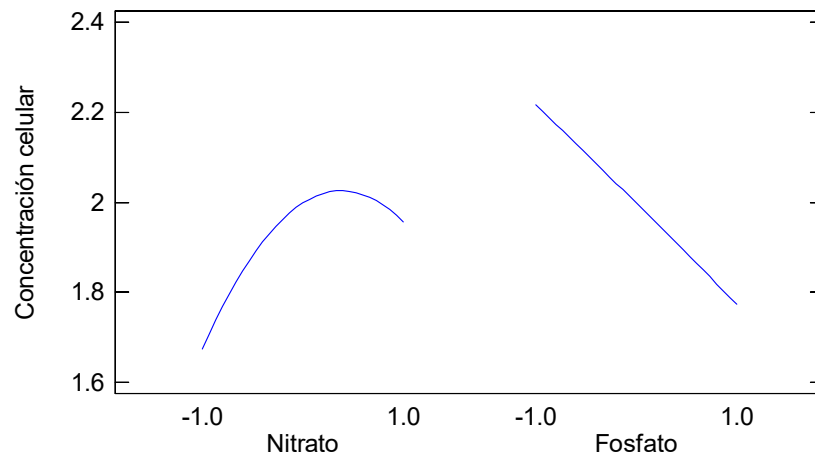
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Nitrato	0,211887	1	0,211887	9,54	0,0103
B:Fosfato	0,519931	1	0,519931	23,41	0,0005
AA	0,121455	1	0,121455	5,47	0,0393
AB	0,203841	1	0,203841	9,18	0,0115
BB	0,0000259304	1	0,0000259304	0,00	0,9734
Error total	0,244302	11	0,0222092		
Total (corr.)	1,27034	16			

El diagrama de Pareto (Gráfica 30) corrobora lo observado en el ANOVA. Se aprecia que el comportamiento del nitrato y del fosfato es inverso, lo que quiere decir que cuando hay aumento en los niveles de nitrato en el medio, la concentración celular crece, caso contrario ocurre con el aumento del fosfato en el medio, donde la respuesta es una disminución de la concentración celular.



Gráfica 30. *Diagrama de Pareto para concentración celular*

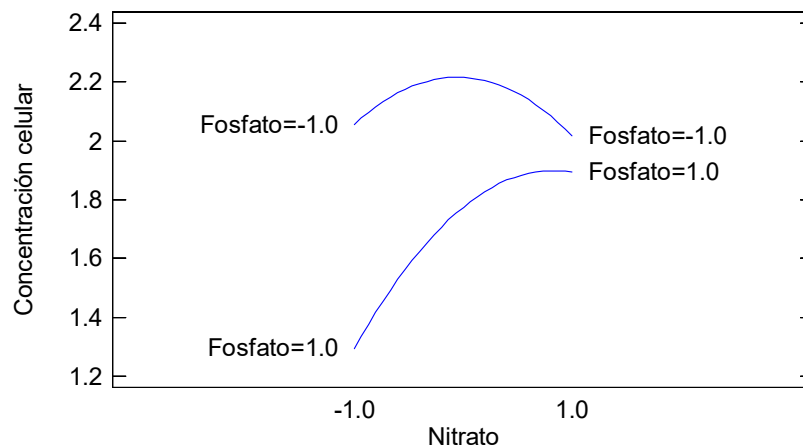
Esta situación queda descrita en la Gráfica 31, la cual muestra los efectos principales. Aquí se puede observar además que la tendencia lineal descrita por el comportamiento de los niveles de fosfato, sugiere que la disminución en la concentración de este, genera la misma respuesta en cuanto a la concentración celular.



Gráfica 31. *Efectos principales para concentración celular*

Las interacciones de los niveles de nitrato y fosfato dadas en el proceso, nuevamente evidencian la disminución de la concentración celular cuando el

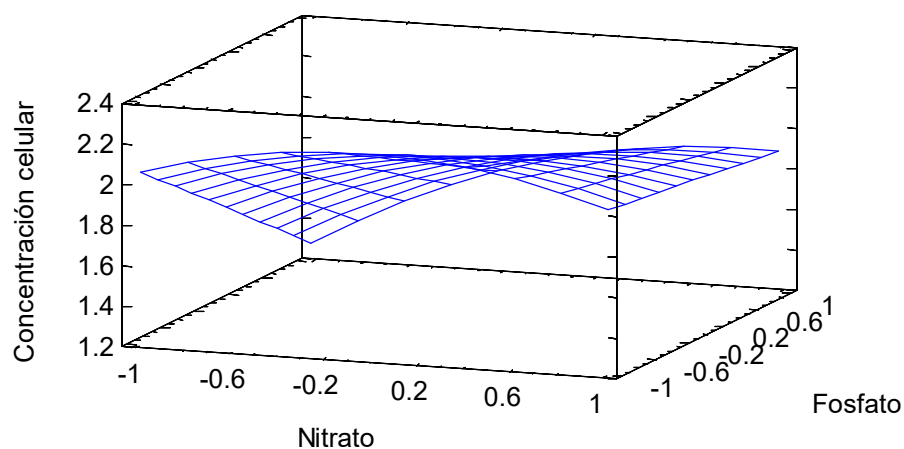
nitrito se encuentra en las menores condiciones experimentales. Las condiciones más bajas para concentración celular se dan en los niveles inferiores de nitrito (-1) y los puntos más altos de fosfato (+1).



Gráfica 32. Interacción de efectos para concentración celular

Para el análisis de las condiciones más favorables del proceso, se debe prestar atención a la curva generada entre los niveles (-1,1) del nitrito y el nivel (-1) del fosfato. En dicha curva se presenta un punto de inflexión que genera un máximo global del proceso en niveles superiores de nitrito, alcanzando una concentración máxima de concentración celular alrededor de 2,2 (g/L).

La superficie de respuesta (Gráfica 33) determina las condiciones en las que se maximiza la concentración celular del sistema. Este máximo de concentración se da en la medida en que el fosfato pasa de un nivel superior a uno inferior y la concentración de nitrito se encuentra en la región media del proceso.



Gráfica 33. Superficie de respuesta estimada para concentración celular

La tabla 20 describe los valores óptimos de trabajo para alcanzar la máxima concentración celular de 2,216 (g/L)

Tabla 20. Puntos óptimos para concentración celular

<i>Factor</i>	<i>Óptimo</i>	<i>Concentración en el medio (g/L)</i>
Nitrato	-0,05	0.084
Fosfato	-1,0	0.08

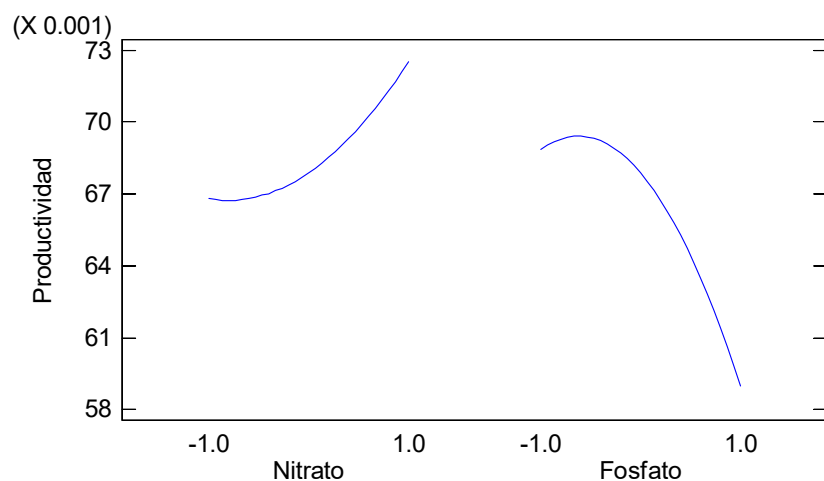
Productividad

El análisis de varianza (tabla 21) determina claramente que el factor que influye significativamente en la productividad del proceso es la concentración de fosfato. Posiblemente el hecho de que los otros factores y sus interacciones no sean relevantes en el sistema, puede deberse a que los niveles que se utilizaron para el análisis corresponden a rangos muy pequeños donde no se perciben cambios en la productividad. El factor limitante es el fosfato, contrario independiente de las concentraciones de nitrato en el medio.

Tabla 21. Análisis de varianza para productividad (g/L.d)

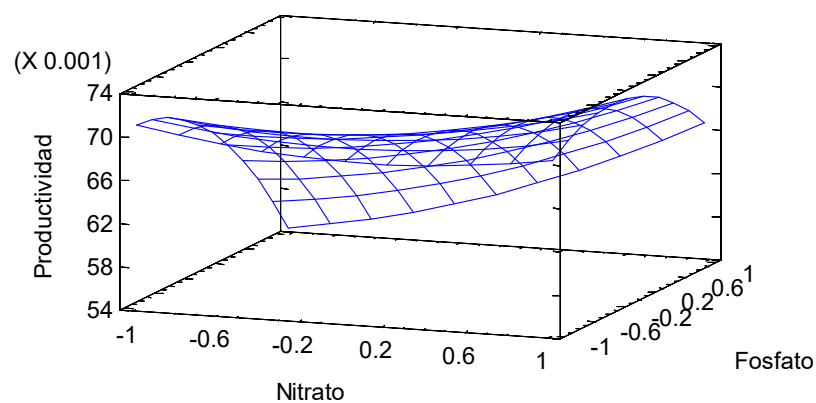
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor-P
A:Nitrato	0,000086372	1	0,000086372	3,80	0,0773
B:Fosfato	0,000259655	1	0,000259655	11,42	0,0062
AA	0,0000116208	1	0,0000116208	0,51	0,4896
AB	0,0000845	1	0,0000845	3,72	0,0801
BB	0,0000581275	1	0,0000581275	2,56	0,1382
Error total	0,000250118	11	0,000022738		
Total (corr.)	0,000801778	17			

El análisis individual de los factores (Gráfica 34) indica que el fosfato es la variable que incide significativamente en la productividad. Aquí se observa que cambios en el fosfato de -1 a 1 genera una disminución en la productividad de 0,07 a casi 0,06 (g/L.d).



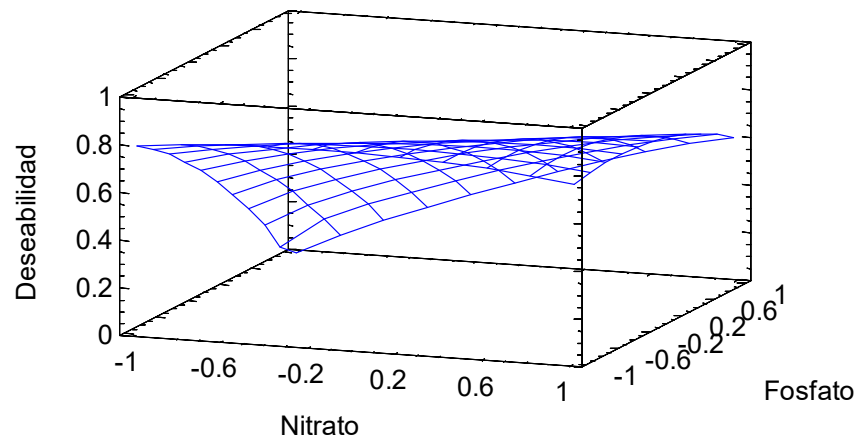
Gráfica 34. Efectos principales para productividad

La superficie de respuesta (Gráfica 35) describe una dinámica tipo silla de montar, donde se establece que las mejores condiciones del proceso se localizan en regiones donde el fosfato presenta concentraciones intermedias y altas para el nitrato, razón por la cual, se evidencia como los valores de productividad aumenta cuando las concentraciones de fosfato se acercan al punto medio (0).



Gráfica 35. Superficie de respuesta estimada para productividad (g/L.d)

Para alcanzar valores óptimos de 2.210 (g/L) y 0.07(g/L.d) para concentración celular y productividad, respectivamente, el análisis de optimización (gráfica 36) propone óptimos de concentración para nitrato y fosfato donde se da la deseabilidad del proceso.



Gráfica 36. Superficie de respuesta para la optimización de múltiples respuestas

En esta superficie se detallan los puntos ideales en condiciones de nitrato intermedias y de fosfato bajas. En la tabla 22 se muestran las condiciones óptimas que maximizan la concentración celular (g/L) y la productividad (g/L.d)

Tabla 22. Condiciones óptimas de concentración en el medio Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L.d)

Factor	Óptimo	Concentración en el medio (g/L)
Nitrato	-0,23	0.73
Fosfato	-1,0	0.08

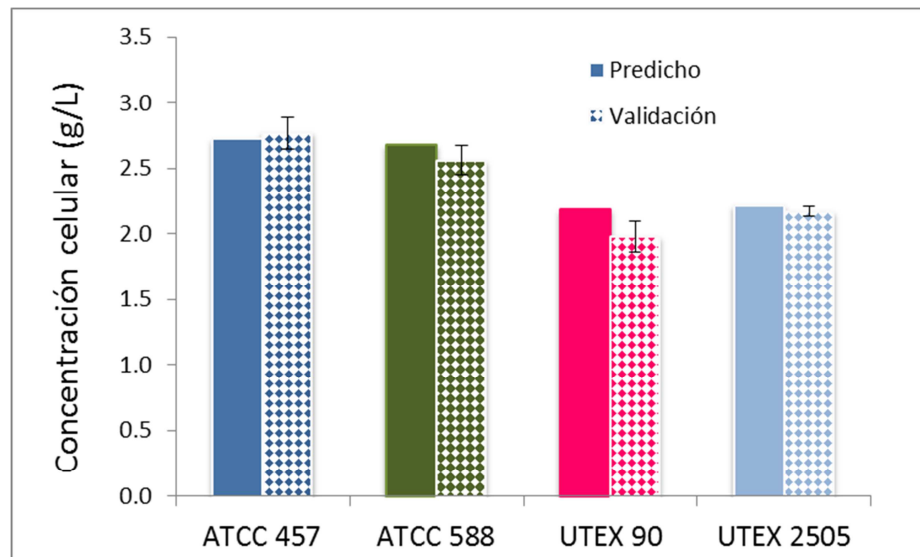
7.5. Ensayo de Validaciones para la optimización de la concentración celular y la productividad del sistema

La validez de la estimación de los puntos de mejor operabilidad en la región experimental de cada cepa estudiada, se comprueba realizando un experimento adicional en las condiciones ideales calculadas por el sistema siguiendo la ruta de máxima pendiente. Tras la realización de los cultivos de validación, se obtienen

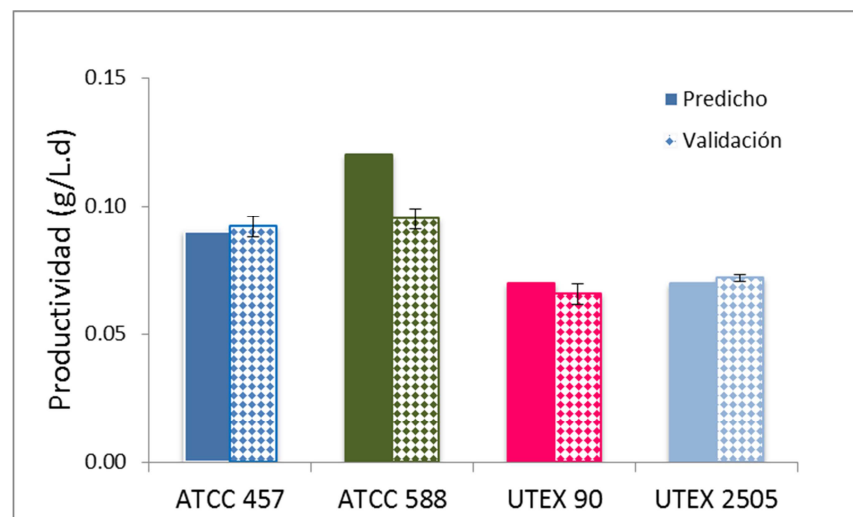
valores de concentración celular (g/L) y de productividad (g/L.d) para cada una de las cepas estudiadas en el ensayo de medios. Con los resultados obtenidos para cada variable de respuesta y teniendo en cuenta los intervalos de confianza para dichos resultados, se establece si estos valores de validación experimental se encuentran dentro de la región de establecida por los modelos en el punto de mejor operabilidad, confirmando así la validez de los modelos para explicar la respuesta de concentración celular y productividad en función de los factores estudiados.

La gráfica 37 presenta los valores de concentración celular (a) y productividad (b) observados, en contraste, con los valores predichos en los análisis de superficie de múltiples respuestas. Los resultados de la validación corresponden al promedio de 4 réplicas por cada punto evaluado en las cuatro cepas de microalgas.

(a)



(b)



Gráfica 37. Valores de concentración celular (g/L) (a) y productividad (g/L.d) (b) predichos y validados

Teniendo en cuenta los resultados de validación de los puntos óptimos donde se maximizan las respuestas de Concentración Celular (g/L) y Productividad (g/L), se establece claramente, que dichas predicciones se encuentran dentro de la región experimental del proceso establecido para cada cepa de trabajo (Anexo II). Es decir, que bajo un intervalo de confianza del 95%, las predicciones en las respuestas de concentración celular y productividad propuestas en el análisis de máximo ascenso, son coherentes con la región experimental evaluada en este ensayo, confirmando la validez de los modelos para describir la concentración celular (g/L) y la productividad (g/L.d) generada en los sistemas de cultivo de las cepas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505.

8. CONCLUSIONES

1. Los resultados de concentración celular (g/L) y Productividad (g/L.d) encontrados en los ensayos de crecimiento con Aire + CO₂ no mostraron un aumento significativo para el conjunto de cepas estudiadas. Esta situación pudo estar influenciada por el poco tiempo de residencia del gas en el medio, y por ende la poca asimilación de este compuesto por parte de las microalgas.
2. Para la elección de cuatro cepas de microalgas candidatas en la captura de CO₂ se tuvieron en cuenta criterios de selección como producción de biomasa, Productividad, facilidad de separación, metabolitos potenciales y adherencia a pared. En este sentido se destacan las cepas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505 dentro de las 9 cepas estudiadas.
3. En el estudio de medios, es notable que de los dos factores de estudio, es la concentración de NaNO₃ la que mayor incide significativamente en la Concentración celular y en la Productividad de los sistemas.
4. Cuando se evaluaron los niveles bajos de nitrato en el medio, éste se volvió un factor limitante, por lo que se reportaba disminución en la producción celular. Es posible que las microalgas, al estar en un ambiente con limitación de nitrato, hayan redireccionado su metabolismo a la acumulación de otros compuestos y no al crecimiento (Chisti, 2007), como puede suceder con la producción de carotenoides, en el caso de *H. pluvialis* (Cordero et al., 1996)
5. Cuando en la cepa ATCC 457, se evaluaron los niveles más bajos de nitrato y de fosfato, se obtuvieron resultados de 1.98 (g/L) para

concentración celular. Esta situación se sustenta en el hecho de que para el género de *scenedesmus*, la tasa de crecimiento reduce cuando estos dos elementos se vuelven limitantes en el medio (Kunikane, *et al.*, 1984).

6. La producción celular de la cepa ATCC 588 mostró sus valores más bajos en los tratamientos en que se evaluaron los niveles más bajos de concentración en el medio de nitrato, con 1.92, 1.88 y 1.91 (g/L). Esto corrobora la sensibilidad de esta cepa a cambios en los niveles de este nutriente, debido a la influencia tan significativa que tienen los niveles de nitrato y el efecto cuadrático del mismo sobre la concentración celular alcanzada por el sistema, mostrando que el crecimiento celular siempre se favorece cuando se aumentan las proporciones de este compuesto en el medio de cultivo.
7. Para la cepa UTEX 90, se presenta una situación contraria a lo que sucedió con las demás especies evaluadas y en términos generales, un poco diferente a lo reportado por la literatura para el crecimiento normal de las microalgas. Esta cepa en particular, es sensible el factor limitante del crecimiento fue el fósforo. Esto determinó los resultados de concentración celular y productividad, donde la interacción de los factores evaluados determina los resultados obtenidos, pero su sensibilidad es marcada a los cambios en la concentración de fosforo en el medio.
8. Para el crecimiento de la cepa UTEX 2505, es importante la interacción entre los niveles de nitrato y fosfato, donde se observa que el crecimiento se favorece en la medida que el nitrato permanezca en la región intermedia y el fosfato se halle en concentraciones bajas. Según reportes de la literatura, esto puede suceder porque la cepa tiene la capacidad de producir y almacenar polifosfatos en pequeñas vacuolas que pueden romperse por actividad enzimática y liberar moléculas de fosfato para ser utilizadas en el

metabolismo celular (Eixler et al., 2006).

9. El análisis de superficie de múltiples respuestas, sugiere los puntos óptimos en los cuales la concentración celular y la productividad se pueden maximizar. En el caso de la cepa UTEX 90, estos puntos de optimización, coinciden con un nivel de concentraciones evaluado dentro del estudio, es decir, el nivel en el que la concentración de nitrato es (-1) y la de fosfato (+1). Para las demás cepas, los óptimos coinciden en niveles de concentración de nitrato altos. Esto demuestra la importancia que tiene este compuesto en el crecimiento de las microalgas. Además, solo hay efecto significativo de la interacción de nitrato y fosfato, para la cepa ATCC 457. En las demás cepas, esta interacción no ejerce influencia en la concentración celular alcanzada por los sistemas. En cuanto a la optimización, los puntos donde se obtiene la mayor deseabilidad para maximizar la concentración celular y la Productividad en cultivos con las cepas ATCC 457, ATCC 588 y UTEX 2505 se encuentran dentro de la región experimental, pero ninguno coincide con un nivel ya evaluado.
10. Las predicciones determinadas por el sistema en el análisis de superficie de múltiples respuestas es coherente en todos los casos de validación, con las regiones experimentales del ensayo de medios de cultivo con las cepas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505.

9. RECOMENDACIONES

1. Los resultados de este trabajo son un paso preliminar en el estudio de las características de crecimiento de microalgas para captura de CO₂. Se sugiere el estudio de otras variables como luz, temperatura y pH, así como la evaluación de diferentes fuentes en los nutrientes con el fin de determinar los factores de crecimiento que permitan obtener mejores resultados en cuanto a la producción de biomasa y de la productividad.
2. En la medida de las posibilidades legales, es recomendable el trabajo experimental con cepas nativas aisladas, con el fin de determinar su eficiencia en cultivos destinados a la captura de CO₂, además de su caracterización en cuanto a metabolitos y sus potencialidades a nivel comercial.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I. Composición de los medios de cultivo utilizados para el mantenimiento de las microalgas y en los ensayos de crecimiento con Aire y Aire + CO₂

Bold Basal Medium (BBM)

#	Compuesto	Solución Stock (g/L dH ₂ O)	Cantidad usada (mL)
1	NaNO ₃	25	10
2	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	20	10
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5	10
4	K ₂ HPO ₄	7.5	10
5	KH ₂ PO ₄	17.5	10
6	NaCl	2.5	10
7	EDTA Na ₂	10	1
8	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	4.98	1
9	H ₃ BO ₃	11.5	1
10	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8.8	1
11	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1.44	1
12	Mo O ₃	0.71	1
13	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57	1
14	(NO ₃) ₂ Co · 6 H ₂ O	0.49	1

Fuente: Algal Culturing Techniques

Medio Proteasa

#	Compuesto	Cantidad
1	BBM	1 L
2	Peptona proteasa	1 g/L

Fuente: UTEX The Culture Collection of Algae

10.2. Anexo II. Ensayos de crecimiento con Aire.

Concentración Celular por cepa

ATCC 457		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
5	0.12	0.02
7	0.41	0.06
10	0.75	0.12
13	1.21	0.13
15	1.29	0.06
18	1.32	0.09
22	1.68	0.09
24	1.50	0.14
26	1.84	0.09
28	1.85	0.09
31	2.02	0.04

ATCC 429		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
4	0.03	0.03
7	0.14	0.08
9	0.40	0.02
11	0.37	0.06
14	0.56	0.14
18	0.76	0.12
21	0.95	0.19
24	1.49	0.35
26	1.29	0.14
28	1.37	0.11
31	1.29	0.15

ATCC 464		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
5	0.03	0.01
7	0.19	0.04
10	0.60	0.23
13	0.67	0.10
15	0.65	0.13
18	0.95	0.05
22	1.10	0.07
24	0.94	0.04
26	1.25	0.02
28	1.25	0.04
31	1.42	0.04

UTEX 1230		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
5	0.22	0.06
7	0.38	0.23
10	0.65	0.17
13	1.01	0.24
15	0.97	0.03
18	1.08	0.11
22	1.04	0.10
24	0.86	0.03
26	1.08	0.05
28	1.06	0.10
31	1.10	0.14

ATCC 468		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
5	0.02	0.01
7	0.18	0.04
10	0.30	0.05
13	0.54	0.05
15	0.57	0.01
18	0.70	0.02
22	0.76	0.01
24	0.68	0.02
26	0.82	0.05
28	0.84	0.05
31	0.93	0.04

ATCC 853		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
5	0.10	0.02
7	0.44	0.08
10	1.00	0.12
13	1.41	0.11
15	1.51	0.10
18	1.66	0.09
22	1.64	0.06
24	1.47	0.06
26	1.72	0.06
28	1.68	0.04
31	1.73	0.05

UTEX 90		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
4	0.11	0.04
7	0.19	0.19
9	0.31	0.03
11	0.37	0.14
14	0.73	0.10
18	0.87	0.17
21	0.86	0.20
24	1.10	0.30
26	1.23	0.28
28	1.31	0.27
31	1.29	0.19

ATCC 588		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
4	0.10	0.02
7	0.25	0.12
9	0.29	0.07
11	0.33	0.10
14	0.42	0.12
18	0.96	0.13
21	1.13	0.11
24	1.23	0.08
26	1.40	0.07
28	1.34	0.03
31	1.50	0.02

UTEX 2505		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
4	0.10	0.05
7	0.16	0.04
9	0.35	0.10
11	0.46	0.12
14	0.53	0.17
18	0.82	0.14
21	1.11	0.16
24	1.33	0.15
26	1.50	0.19
28	1.48	0.23
31	1.60	0.16

Análisis estadístico para Concentración Celular

ANOVA Concentración celular (g/L)					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.62498	8	0.203123	4.07	0.0064
Intra grupos	0.899099	18	0.0499499		
Total (Corr.)	2.52408	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración celular por Cepa			
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD			
Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1230	3	1.10667	A
429	3	1.28533	A
90	3	1.289	A
468	3	1.33333	A
853	3	1.41333	AB
464	3	1.5	AB
588	3	1.50367	AB
2505	3	1.60367	AB
457	3	2.02167	B

Productividad por cepa

Cepa	ATCC 457	ATCC 429	ATCC 464	UTEX 1230	ATCC 468	ATCC 853	UTEX 90	ATCC 588	ATCC 2505
Productividad (g/L.d)	0.067	0.049	0.048	0.036	0.043	0.046	0.047	0.051	0.058
Error (g/L.d)	0.001	0.005	0.001	0.006	0.003	0.005	0.010	0.001	0.007

Análisis estadístico para Productividad

ANOVA Productividad (g/L.d)					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00106267	8	0.000132833	1.65	0.1786
Intra grupos	0.001446	18	8.03333E-05		
Total (Corr.)	0.00250867	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad por Cepa

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1230	3	0.035667	A
468	3	0.043	A
853	3	0.045333	A
90	3	0.046667	A
464	3	0.048333	A
429	3	0.049333	A
588	3	0.051	A
457	3	0.056	A
2505	3	0.057667	A

10.3. Anexo III. Ensayos de crecimiento con Aire + CO₂.

ATCC 457		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0
4	0.15	0.03
6	0.17	0.06
8	0.37	0.09
10	0.65	0.09
12	0.92	0.13
14	1.06	0.09
17	1.28	0.08
21	1.51	0.09
24	1.90	0.12
27	2.10	0.20
30	2.26	0.29

ATCC 429		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
3	0.27	0.07
5	0.12	0.11
7	0.31	0.06
9	0.43	0.03
11	0.69	0.08
13	0.92	0.04
15	1.11	0.08
17	1.27	0.03
20	1.43	0.06
24	1.03	0.45
27	1.33	0.09
30	1.63	0.11

ATCC 464		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
3	0.35	0.06
5	0.44	0.01
7	0.55	0.11
9	0.81	0.16
11	0.86	0.07
13	1.08	0.06
15	1.48	0.08
17	1.40	0.04
20	1.52	0.15
24	1.93	0.18
27	0.94	0.65
30	1.67	0.08

UTEX 1230		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0
4	0.11	0.05
6	0.18	0.02
8	0.24	0.01
10	0.52	0.12
12	0.71	0.04
14	0.81	0.03
17	0.76	0.07
21	1.00	0.03
24	1.09	0.04
27	1.10	0.04
30	1.26	0.05

ATCC 468		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0
4	0.143	0.062
7	0.230	0.024
10	0.226	0.049
13	0.300	0.067
16	0.430	0.064
19	0.593	0.043
22	0.715	0.064
25	0.941	0.055
28	1.233	0.084
31	1.430	0.055

ATCC 853		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0
4	0.08	0.08
6	0.23	0.09
8	0.26	0.08
10	0.52	0.09
12	0.78	0.14
14	1.05	0.08
17	1.11	0.03
21	1.35	0.10
24	1.76	0.26
27	1.74	0.26
30	1.49	0.15

UTEX 90		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0
4	0.123	0.062
6	0.113	0.074
8	0.477	0.068
10	0.647	0.101
12	0.793	0.083
14	0.927	0.190
17	1.237	0.149
21	1.513	0.199
24	1.723	0.160
27	1.737	0.157
30	1.890	0.187

ATCC 588		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.02	0.00
3	0.30	0.01
5	0.30	0.08
7	0.32	0.07
9	0.45	0.09
11	1.02	0.14
13	1.22	0.03
15	1.63	0.05
17	1.54	0.24
20	1.95	0.12
24	2.21	0.18
27	1.90	0.09
30	1.95	0.08

UTEX 2505		
Día	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)
1	0.01	0
3	0.04	0.02
5	0.20	0.07
7	0.22	0.12
9	0.40	0.07
11	0.92	0.07
13	1.13	0.13
15	1.53	0.12
17	1.87	0.19
20	2.07	0.13
24	2.60	0.23
27	2.07	0.10
30	2.30	0.11

Análisis estadístico para Concentración Celular

ANOVA Concentración celular (g/L)					
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.16094	8	0.395118	6.49	0.0005
Intra grupos	1.09609	18	0.0608941		
Total (Corr.)	4.25704	26			

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1230	3	1.26333	A
468	3	1.42967	A
853	3	1.49	A
429	3	1.63333	AB
464	3	1.67033	AB
90	3	1.89	AB
588	3	1.948	AB
457	3	2.26333	B
2505	3	2.30367	B

Productividad por cepa

Cepa	ATCC 457	ATCC 429	ATCC 464	UTEX 1230	ATCC 468	ATCC 853	UTEX 90	ATCC 588	ATCC 2505
PPPPPPPPPPPPPPPPPPPP	0.075	0.070	0.081	0.047	0.028	0.073	0.071	0.097	0.103
PPPPPPPPPPPP	0.010	0.003	0.002	0.002	0.002	0.011	0.007	0.006	0.006

Análisis estadístico para Productividad

ANOVA Productividad (g/L.d)					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00880385	8	0.00110048	9.1	0.0001
Intra grupos	0.00217667	18	0.000120926		
Total (Corr.)	0.0109805	26			

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad por Cepa

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
468	3	0.046	A
1230	3	0.046667	A
429	3	0.070667	AB
90	3	0.071333	ABC
853	3	0.072667	ABC
457	3	0.074667	ABC
464	3	0.081	BC
588	3	0.096667	BC
2505	3	0.102667	C

10.4. Anexo IV. Ensayo de medios de cultivo con las cepas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505

Cepa ATCC 457

Tratamiento	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)	Productividad (g/L.d)	Error (g/L.d)
1	2.65	0.04	0.07	0.01
2	2.65	0.12	0.08	0.01
3	1.98	0.09	0.07	0.01
4	2.17	0.01	0.10	0.01
5	2.75	0.10	0.09	0.00
6	2.33	0.01	0.09	0.00
7	2.05	0.26	0.08	0.01
8	2.61	0.01	0.09	0.00
9	2.21	0.10	0.07	0.01

Cepa ATCC 588

Tratamiento	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)	Productividad (g/L.d)	Error (g/L.d)
1	2.63	0.19	0.10	0.01
2	2.59	0.25	0.10	0.01
3	1.92	0.22	0.07	0.01
4	2.39	0.01	0.08	0.00
5	2.61	0.08	0.13	0.00
6	1.88	0.14	0.09	0.01
7	2.41	0.03	0.09	0.00
8	2.66	0.15	0.09	0.01
9	1.91	0.06	0.08	0.00

Cepa UTEX 90

Tratamiento	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)	Productividad (g/L.d)	Error (g/L.d)
1	1.94	0.00	0.07	0.000
2	1.88	0.00	0.06	0.000
3	2.18	0.03	0.08	0.003
4	1.86	0.05	0.07	0.002
5	1.80	0.05	0.07	0.002
6	1.92	0.00	0.08	0.000
7	1.92	0.18	0.06	0.006
8	1.54	0.07	0.05	0.002
9	1.74	0.01	0.06	0.000

Cepa UTEX 2505

Tratamiento	Concentración celular (g/L)	Error (g/L)	Productividad (g/L.d)	Error (g/L.d)
1	1.87	0.03	0.07	0.00
2	1.69	0.09	0.06	0.00
3	1.40	0.04	0.06	0.00
4	2.28	0.04	0.08	0.00
5	1.99	0.07	0.07	0.00
6	1.51	0.07	0.07	0.01
7	1.94	0.21	0.07	0.01
8	2.04	0.11	0.07	0.00
9	2.11	0.03	0.07	0.00

10.5. ANEXO V. Ensayos de validación para la optimización de la Concentración Celular y la Productividad para las microalgas ATCC 457, ATCC 588, UTEX 90 y UTEX 2505

Concentración celular

ATCC 457	
Concentración celular promedio (g/L)	Error (g/L)
0.10	0.00
0.31	0.06
0.26	0.09
0.81	0.03
0.84	0.07
1.41	0.17
1.64	0.13
1.88	0.08
2.25	0.12
2.70	0.09
2.77	0.12

ATCC 588	
Concentración celular promedio (g/L)	Error (g/L)
0.10	0.00
0.16	0.07
0.61	0.03
0.80	0.08
0.94	0.04
1.23	0.09
1.62	0.03
1.51	0.11
2.09	0.06
2.37	0.10
2.56	0.11

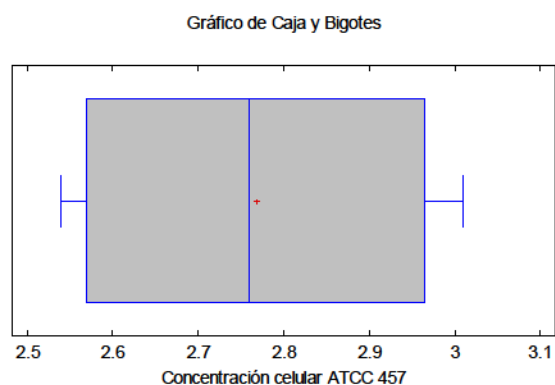
UTEX 90	
Concentración celular promedio (g/L)	Error (g/L)
0.10	0.00
0.13	0.04
0.28	0.11
0.39	0.07
0.51	0.06
0.83	0.12
0.92	0.09
1.16	0.20
1.06	0.09
1.52	0.09
1.98	0.12

UTEX 2505	
Concentración celular promedio (g/L)	Error (g/L)
0.10	0.00
0.34	0.03
0.52	0.03
0.69	0.04
0.89	0.02
1.12	0.01
1.60	0.04
1.88	0.04
2.08	0.01
2.18	0.12
2.17	0.04

Análisis estadístico para Concentración celular por cepa

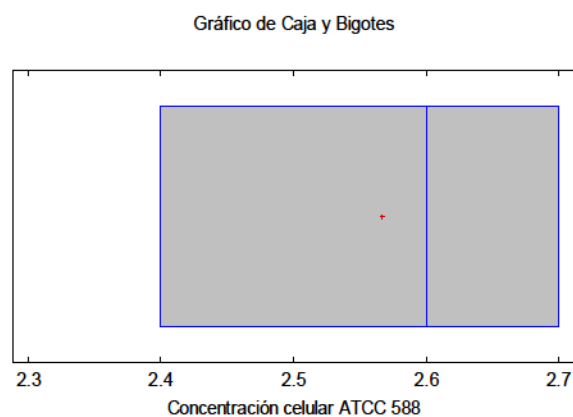
- **ATCC 457**

Recuento	4
Promedio	2.7675
Desviación Estándar	0.232289
Coefficiente de Variación	8.39%
Mínimo	2.54
Máximo	3.01
Rango	0.47
Sesgo Estandarizado	0.0578957
Curtosis Estandarizada	-2.02228



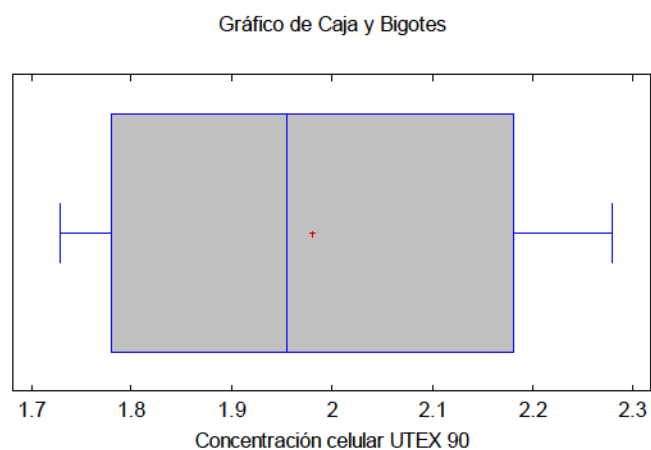
- **ATCC 588**

Recuento	3
Promedio	2.56667
Desviación Estándar	0.152753
Coefficiente de Variación	5.95%
Mínimo	2.4
Máximo	2.7
Rango	0.3
Sesgo Estandarizado	-0.6613
Curtosis Estandarizada	



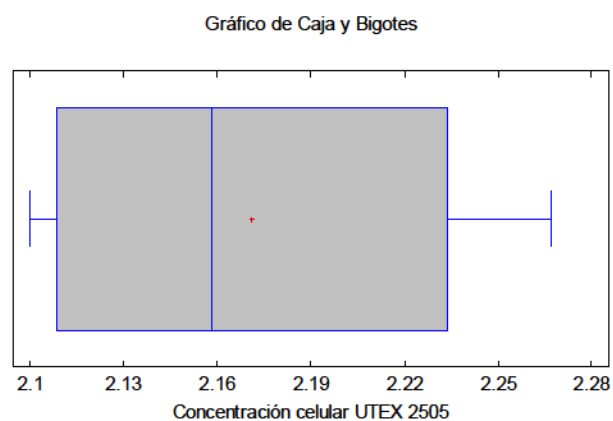
- **UTEX 90**

Recuento	4
Promedio	1.98
Desviación Estándar	0.248328
Coefficiente de Variación	12.54%
Mínimo	1.73
Máximo	2.28
Rango	0.55
Sesgo Estandarizado	0.319912
Curtosis Estandarizada	-0.99796



- **UTEX 2505**

Recuento	4
Promedio	2.171
Desviación Estándar	0.07749
Coefficiente de Variación	3.57%
Mínimo	2.1
Máximo	2.267
Rango	0.167
Sesgo Estandarizado	0.460628
Curtosis Estandarizada	-0.99904



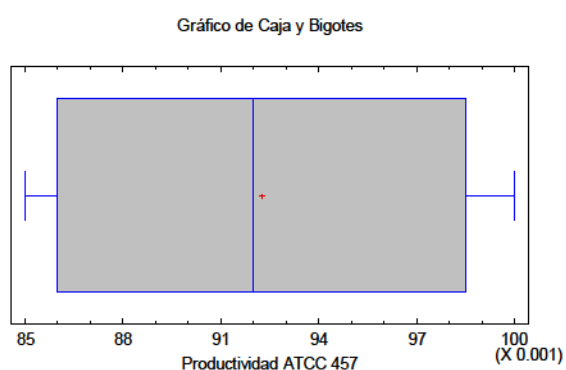
Productividad

Cepa	Productividad promedio (g/L.d)	Error (g/L.d)
ATCC 457	0.092	0.004
ATCC 588	0.095	0.004
UTEX 90	0.066	0.004
UTEX 2505	0.072	0.001

Análisis estadístico Productividad

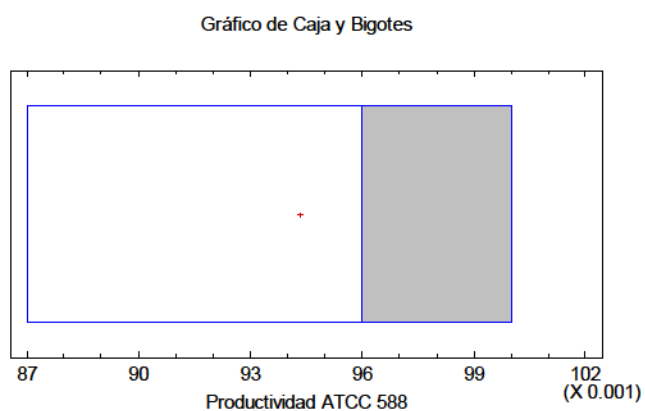
- Cepa ATCC 457**

Recuento	4
Promedio	0.09225
Desviación Estándar	0.007365
Coefficiente de Variación	7.98%
Mínimo	0.085
Máximo	0.1
Rango	0.015
Sesgo Estandarizado	0.063857
Curtosis Estandarizada	-1.97916



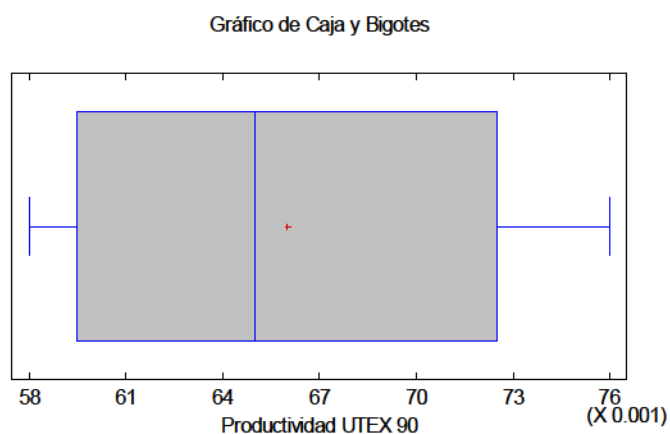
- ATCC 588**

Recuento	3
Promedio	0.094333
Desviación Estándar	0.006658
Coefficiente de Variación	7.06%
Mínimo	0.087
Máximo	0.1
Rango	0.013
Sesgo Estandarizado	-0.74659
Curtosis Estandarizada	



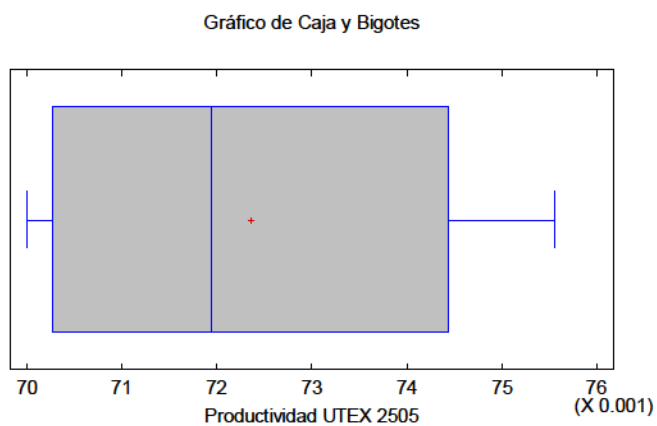
- **UTEX 90**

Recuento	4
Promedio	0.066
Desviación Estándar	0.008124
Coefficiente de Variación	12.31%
Mínimo	0.058
Máximo	0.076
Rango	0.018
Sesgo Estandarizado	0.395924
Curtosis Estandarizada	-0.88716



- **UTEX 2505**

Recuento	4
Promedio	0.072361
Desviación Estándar	0.002581
Coefficiente de Variación	3.57%
Mínimo	0.07
Máximo	0.075556
Rango	0.005556
Sesgo Estandarizado	0.458036
Curtosis Estandarizada	-1.01169



11. BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C. 1995. MICROALGAS: Cultivo y Aplicaciones. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Coruña, Coruña, España.

Administración Nacional Oceánica y Atmosférica de Estados Unidos. Disponible en: governmentshutdown.noaa.gov

Azma M, Mohamed MS, Mohamad R, Abdul-Rahim R, Ariff AB (2011) Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 53:187–195.

Barsanti, Laura y Gualtieri, Paolo., 2006. *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis group. 301 páginas.

Becker EW (1994). *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. London. pp. 301

Benemann, J.R., 2003. Biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae: Technology Roadmap. Final Report submitted to the U.S. Department of Energy National Energy Laboratory and to the Steering Committee of the International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae. Disponible en [www. www.CO2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm](http://www.www.CO2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm)

Borowitzka M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 1999; 70: 313–321.

Brennan L, Owende P (2009). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 557-577

Carvalho AP, Pontes I, Gaspar H, Malcata FX (2006) Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:358-366

Coombs J, Darley WM, Holm-Hansen O, Volcani BE (1967) Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in Diatoms. Chemical composition of *Navicula pelliculosa* during silicon-starvation synchronyl. *Plant Physiology*. 42:1601-1606.

Coradin T, Desclés J, Luo G, López PJ (2006) Silicon in the photosynthetic lineages: Molecular mechanisms for uptake and deposition. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Vol. IV. Global Science Books, UK. p. 238-244.

Cuaresma M, Janssen M, Vilchez C, Wijffels RH (2011) Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. *Bioresource Technology* 102:5129–5137.

Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JH (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol* 102(1):71-81

Cheng LH, Zhang L, Chen HL, Gao CJ. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. Sep Purif Technol 2006;50:324–9.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 2007; 25: 294 – 306.

Converti A, Lodi A, Del Borghi A, Solisio C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. Biochemical Engineering Journal 2006;32(1):13–8

Cordero, B., Otero, A., Patino, M., Arredondo, B.O. and Fabregas, (1996). Astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis*, under different condition stress. J. Biotechnol. Lett., 18: 213- 218.

Eixler, S., Karsten, U., Selig, U. 2006. Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. Phycologia 45 (1): 53–60.

Fernández SJM, Cerón GMC, Sánchez MA, Belarbi EH, García CF, Molina GE (2004) Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in Fed-batch mode. Biotechnol Prog 20:728-736.

Florencio FJ, Vega JM (1983) Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. Photoproduction of ammonium. Planta 158, 288-293

González B., E. Buitrago y K. Frontado. 1999. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. Memoria Tomo LIX, número 151, 75-84.

González López, C.V., Acién Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Fernández, J.F., Cerón García, M.C., Molina Grima, E., 2009. Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO₂ removal processes. *Bioresource Technology* 100 (23), 5904–5910.

González-López, C.V., Acién, F.G., Fernández Sevilla, J.M., Molina, E. 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂ *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 93-106

Graham, L., and L. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice Hall Press. New Jersey.

Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX (2011) Microalgae as sources of high added-value compounds-A brief review of recent work. *Biotechnol. Prog.* 27(3):597-611.

Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* 32, 169-204

Gutiérrez, H., de la Vara, R., 2004. *Análisis y diseño de experimentos*. Ed. McGraw Hill/Interamericana. México.

Kaplan, D., Richmond, A. Dubisky, Z. y Aronson, J. 1986. Algal nutrition. En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. A.E. Richmond (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 147-198 p.

Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:1037–1047.

Huang, G., Chen, F., Wei, d., Zhang, X. & Chen, g. 2010. Biodiesel production by Microalgal biotechnology. *Applied energy*, 87, 38-46

International Energy Outlook, 2003. Energy Information Administration. Office of Integrated Analysis and Forecasting. U.S. Department of Energy. Washington, DC 20585. Disponible en: www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html.

IPCC, 2005. Intergovernmental Panel on Climate Change. Special Report on Carbon Capture and Storage 2005. Disponible en: www.ipcc.ch.

Jun Cheng, Yun Huang, Jia Feng, Jing Sun, Junhu Zhou, Kefa Cen. 2013. Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing Chlorella PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. Bioresource Technology, 144, 321–327

OMM, 2011. Organización Meteorológica Mundial. Disponible en: www.wmo.int

Kaplan, D., Richmond, A. Dubisky, Z. y Aronson, J. 1986. Algal nutrition. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. A.E. Richmond (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 147-198 p.

Kunikane, S.; Kaneko, M. and Maehara, R. (1984). Growth and nutrient uptake of green alga, Scenedesmus dimorphus, under a wide range of nitrogen-phosphorus ratio(I). Experimental study, Wat. Res., 18 (10), 1299-1311.

Lara MA., Moreno JL., Amaro E.J. 1996. Fitoplancton: Conceptos básicos y técnicas de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Lebeau T, Robert JM (2003) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part. I : Cultivation at various scales. Appl Microbiol Biotechnology 60 :612-623.

Lee SH, Chang DU, Lee BJ, Jeon YJ (2009) Antioxidant activity of solubilized *Tetraselmis suecica* and *Chlorella ellipsoidea* by enzymatic digests. *J Food Sci Nutr* 14:21-28.

Li M, Xie X, Xue R, Liu Z (2006) Effects of strontium-induced stress on marine microalgae *Platymonas subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). *Chinese J Oceanol Limnol* 24(2):154-162.

Li Y, Horsman M., Wu N, Lan CQ and Dubois-Calero N (2008): Biofuels from microalgae. *Biotech Prog* (in press) ASAP Article, DOI 10.1021/bp070371kS8756-7938(07)00371-2

MacIntyre HL, Sharkey TD, Geider RJ (1997) Activation and deactivation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in three marine microalgae. *Photosynthesis Research* 51: 93–106.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1999. *Brock, Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia. Madrid. España

Mathews C., van Holde K. 2005. *Bioquímica*. 3a edición. Ed. Pearson. España.

Miflin BJ (1974) The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. *Plant Physiol* 54, 550-555

Minillo, A., Godoy. H. C., Fonseca, G. G., (2013). Growth Performance of Microalgae Exposed to CO₂. *Journal of Clean Energy Technologies*, Vol. 1, No. 2,

Molina E, Fernández J, Ación F.G, Chisti Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology* 2001; 92: 113–131.

Ortega, J., R. Moronta y E. Morales. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. *Ciencia* 12(1): 25-31.

Perner-Nochta I, Posten C. Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 2007; 131: 276–285.

Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 287-293.

Qin J. Bio - Hydrocarbons from microalgae Impacts of temperature, light and salinity on the algae growth. A report for the rural industries research and development corporation 2005; Australian Government.

Ramanan, R., Kannan, K., Deshkar, A., Yadav, R., Chakrabarti, T., 2010. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. *Bioresource Technology* 101 (8), 2616–2622.

Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC (2011) A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energy Res.* 35:291–311.

Serrano, L. M., Ramírez, D. M., Sierra, E. R., Scott, O. M., Álvarez, C. A., Torres, J. M., Narváez, P.C. and Godoy R.D. (2011). Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella vulgaris* LAUN 0019. *ITECKNE*, 8(1), 15-22.

Skjanes K., Lindblad P., Muller J. 2007. BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. *Biomol Eng.* 24: 405-413.

Spreitzer RJ, Salvacci ME (2002). RUBISCO: structure, regulatory interaction and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:449–75.

Sunda, W. G. and Huntsman, S. A., Relationship among photoperiod, carbon fixation, growth, chlorophylla, and cellular iron and zinc in a coastal diatom, *Limnology Oceanography*, 49, 1742–1753, 2004.

UNESA Asociación Española de la Industria Eléctrica, 2005. Metodologías para la Implementación de los Mecanismos flexibles de Kioto –Mecanismo de Desarrollo Limpio en Latinoamérica. Capítulo 8.

Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higon G (2001) *Industrial Microbiology: An introduction*. Blackwell Science Ltd., p. 288.

Wang B, Li Y, Wu N, Lan C. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;79(5):707–18

Zaborsky RO, Mitsui A, Clanton C, Black Jr (1983) *Handbook of biosolar resources*. CRC Press, Inc, Florida, USA. p. 657.

Zijffers JWF, Schippers KJ, Zheng K, Janssen M, Tramper J, Wijffels RH (2010) Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors. *Mar Biotechnol* 12:708–718.

